



Pathogénie des entérovirus : étude de la charge virale au cours de méningites et de la permissivité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines

Romain Volle

► To cite this version:

Romain Volle. Pathogénie des entérovirus : étude de la charge virale au cours de méningites et de la permissivité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Biologie cellulaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM05 . tel-01165195

HAL Id: tel-01165195

<https://theses.hal.science/tel-01165195>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT*

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : VIROLOGIE et BIOLOGIE CELLULAIRE

Le 11 Février 2014 par

Romain VOLLE

**PATHOGENIE DES ENTEROVIRUS :
ETUDE DE LA CHARGE VIRALE AU COURS DE
MENINGITES ET DE LA PERMISSIVITE DES
CELLULES ENDOTHELIALES MICROVASCULAIRES
CEREBRALES HUMAINES**

Directeur de Thèse :
Monsieur le Docteur Jean-Luc BAILLY

Devant la commission d'examen composée de

Président : Monsieur le Docteur Pierre-Olivier COURAUD

Rapporteurs : Monsieur le Docteur Francis DELPEYROUX
Monsieur le Professeur Henri AGUT

Examineurs : Monsieur le Docteur Jean-Louis COUDERC
Monsieur le Docteur Jean-Luc BAILLY
Madame le Docteur Christine ARCHIMBAUD

Laboratoire de Virologie EPIE - EA4843
Centre National de Référence *Enterovirus/Parechovirus* laboratoire associé

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères vont en premier lieu aux membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger la pertinence et la qualité de mes travaux.

Je tiens à remercier le Dr. Francis Delpeyroux et le Pr. Henri Agut d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, pour le temps qu'ils y ont consacré, leurs remarques pertinentes, ainsi que leurs encouragements. En espérant que l'arrivée de mon manuscrit au pied du sapin de Noël n'aura pas constitué une mauvaise surprise.

Je remercie chaleureusement le Dr. Pierre-Olivier Couraud d'avoir bien voulu siéger à ce jury et dont la lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales hCMEC/D3 a grandement contribué à la réalisation de ces travaux.

J'exprime toute ma gratitude au Dr. Jean-Louis Couderc pour sa participation, ainsi que pour le suivi de mes travaux lors de mes deux comités de thèse. Je le remercie également pour la formation et le temps qu'il m'a consacré en microscopie confocale.

Mes remerciements les plus profonds, ainsi que mon amitié au Dr. Jean-Luc Bailly d'avoir été mon directeur de thèse, ainsi qu'au Dr. Christine Jallat Archimbaud d'avoir été « officieusement » ma co-directrice de thèse.

Jean-Luc à travers ce mémoire je t'exprime toute ma reconnaissance pour ces merveilleuses années et pour cette découverte de la virologie où j'ai tant appris. Avec l'espérance que ces travaux retranscrivent la qualité de ton enseignement. Puisent-ils contribuer à ton ambition de faire du laboratoire de virologie de Clermont-Ferrand un Walhalla des Enterovirus que ton esprit acéré nous peuplera de génogroupes légendaires.

Christine, c'est avec toi que tout a commencé lors de mon Master. Pour cela je t'en serai éternellement reconnaissant. Au travers de ce mémoire c'est un cycle qui s'achève et un nouveau qui débute. Je te remercie pour ta gentillesse, ton infaillible disponibilité et tes encouragements continus. Tes célèbrissimes répliques, « J'ai une idée ! », « Romain pourrais-tu ? », « j'adore ! » et « Romain t'es comme le bon vin tu t'affine chaque jour » resteront pour moi des souvenirs indélébiles.

J'exprime toute ma gratitude au Pr. Hélène Peigüe-Lafeuille pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de virologie, pour son estime, sa disponibilité et sa confiance sans limite.

Je remercie le CHU de Clermont-Ferrand et plus particulièrement Monsieur Patrick Lacarin de la délégation à la recherche clinique pour avoir permis la réalisation de cette thèse au sein d'une convention Cifre.

Je tiens à remercier avec une attention toute particulière le Dr. Françoise Charbonné pour sa disponibilité, son soutien, son amitié et son expérience de la culture cellulaire qu'elle a si généreusement partagée avec « son lion ».

Je remercie chaleureusement tous les membres passés et présents du laboratoire de virologie du CHU. Le Dr. Cécile Henquell pour son soutien permanent, et ces 2 mémorables soirées de Juin 2010 à démonter les paillasses de l'Hôtel-Dieu pour les envoyer au Burkina-Faso. Par la même j'en profite pour saluer sa générosité et son engagement. Le Dr. Audrey Mirand pour sa gentillesse et sa notion bien à elle des mathématiques (une petite dizaine de prélèvements + 2 = 25 tubes à analyser). Le Dr. Martine Chambon pour ses conseils, son expérience et nos discussions sur l'Australie et la Nouvelle Zélande. Le Dr. Christel Regagnon pour l'éternelle bonne humeur

dont elle gratifie « son Rworwo ». Le Dr. & futur Dr. Amélie Brebion à qui je souhaite tous mes vœux de réussite pour sa thèse. Les techniciennes Josiane P, Mireille & Virginie (secteur cellule) et Annie, Claire, Josiane A, Laurence, Maïté, & Martine (secteur biologie moléculaire) pour leur inépuisable patience et disponibilité. Bien évidemment j'ai aussi une pensée pour les techniciennes de sérologie Brigitte, Christine C, Rose marie, Sylvie, & Marie Paule (Dieu), ainsi que pour les secrétaires Carine, Cathy et Michelle. Pour tous ces bons moments de rigolade et de convivialité en pièce café.

Que les membres travaillant au sein du laboratoire de virologie EPIE-E A4843 de la faculté de médecine trouve ici l'expression de toute ma gratitude. Gwendoline, pour t'avoir eue en face de moi pendant 3 ans avec un bureau plus grand que le mien, et surtout pour ta résistance exceptionnelle à mon humour corrosif. Nathalie notre technicienne aux doigts de fée, ton coursier te remercie pour les marches quotidiennes entre la fac et le CHU. Une pensée pour ses longs mois d'Août à faire tourner le labo tout les deux, quand tout le monde était en vacance. Isabelle (maire de facto), par où commencer chère amie ? Nos séances cafés hebdomadaires, votre engagement dans la culture des cellules, ou bien encore vos inépuisables flagorneries à l'égard de ma divine musculature, la mieux à même de déplacer toutes les charges lourdes dont vous dispensiez Jean-Luc et Chervin. Au final, je ne puis garder de vous toutes, qu'un souvenir impérissable de bonne humeur et de promptes rigolades passées en votre agréable compagnie.

Tous mes encouragements à Chervin pour sa thèse, et mes sincères remerciements pour sa gentillesse, son soutien, sa voiture et les bons souvenirs passés ensemble lors de l'Europic 2012 à St-Raphaël et à l'ECV 2013 à Lyon.

Une pensée pour les stagiaires que j'ai eu l'immense plaisir d'encadrer lors de ma thèse. Rachel Da Silva à qui je souhaite le meilleur et Maxime Bisseux à qui je souhaite bonne chance et réussite dans les travaux de thèse qu'il entreprend au sein du laboratoire.

Mes plus sincères remerciements au Dr. Bruno Pereira pour les nombreuses analyses statistiques et son intérêt continu à mes travaux ; à Claire, Christelle et Lorraine du CICS ainsi que Caroline Vachias de l'ICCF pour la microscopie ; à Fabienne Glaciale de l'équipe de Pierre-Olivier Couraud pour la formation sur la culture des cellules hCMEC/D3.

Une pensée pour le comité d'organisation des journées de l'école doctorale 2012. Repenser à ma thèse c'est bien évidemment se remémorer ces journées que nous avons organisées.

Une pensée également à celui ou celle qui reprendra mon sujet. Il est très exigeant, mais passionnant. De plus ce sera désormais à vous qu'incombera la tâche de faire déjeuner Jean-Luc à 12H30 précisément.

Enfin j'exprime tous mes remerciements et mon amour pour ma famille, qui a toujours été présente. Mes parents Christine et Bernard, mon frère Emeric, mes sœurs Emmanuelle et Laurie-Anne, leurs compagnons respectifs, ma nièce Charline, mes grands-mères et mes défunts grands-pères.



Scientia potentia ad immortalitatem est

RESUME

Pathogénie des entérovirus : Etude de la charge virale au cours de méningites et de la permissivité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines

Les entérovirus humains (EV) constituent un groupe de virus à ARN d'une grande diversité génétique. Ils sont responsables d'infections cérébrales graves mais rares et de méningites bénignes mais fréquentes. Les événements conduisant à l'entrée des EVs dans le système nerveux central (SNC), l'importance de la charge virale dans le liquide céphalo rachidien (LCR) et sa corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel restent peu explorés. Comme de nombreux génotypes d'EV sont associés à des manifestations neurologiques semblables, des processus pathologiques communs sont envisageables. Le premier volet de cette thèse avait pour objectif d'étudier prospectivement la charge virale EV dans le LCR de patients présentant une méningite à l'aide d'une technique de RT-qPCR. Nos résultats montrent que les différences significatives de charge virale retrouvées dans le LCR en fonction de l'âge, des leucocytes et de la protéinorachie sont reliées au génotype de l'EV responsable de l'infection. Le second volet de cette thèse avait pour but d'explorer l'hypothèse qu'une infection de la barrière hémato-encéphalique (BHE), peut représenter une voie d'accès commune à une majorité d'EVs vers le SNC. La réplication et la translocation des EVs ont été évaluées avec un modèle *in vitro* de BHE basé sur la lignée cellulaire hCMEC/D3. Nous avons validé ce modèle cellulaire en montrant une permissivité différentielle à un large éventail d'EVs et montré les spécificités du franchissement de cette barrière par l'EV-A71. Ces données soulèvent la question de l'origine de l'ARN EV dans le LCR au cours des premiers stades d'une méningite.

Mots clefs : Enterovirus, diversité, méningite, barrière hémato encéphalique, charge virale dans le liquide céphalo rachidien

ABSTRACT

Enterovirus pathogenesis: Study of the viral load during meningitis and permissiveness of human brain microvascular endothelial cells.

Human enteroviruses (EV) are RNA viruses characterized by a large genetic variability. They are associated with severe but rare neurological infections and frequent but self-limiting meningitis. The processes of entry into the central nervous system (CNS), the level of EV viral load in the cerebrospinal fluid (CSF) and its possible relation to the intensity of the associated inflammatory process remain poorly understood. As several EV genotypes are related to common neurological disorders, common pathological processes may be involved. In the first part of this PhD thesis, we have prospectively investigated the EV viral load in the CSF of patients with meningitis using a RT-qPCR assay. Our results showed that significant differences between viral load levels and the age groups, the leukocytes count, the protein levels in the CSF, and with the EV genotype involved in the infection. We also explored the hypothesis that an infection of the blood brain barrier (BBB) could be a common pathway used by EVs released in the bloodstream to gain access into the CNS. The EV replication and translocation were analyzed with an *in vitro* model of BBB based on the hCMEC/D3 cell line. We validated this cell model by showing different permissivity patterns among a large array of EV genotypes. In addition, we showed the specificities in how the EV-A71 crosses the endothelial barrier. The overall data raise the unresolved issue of the origin of viral RNA in the CSF and the sources of infection during the early acute stage of EV meningitis.

Keywords: Enterovirus, diversity, meningitis, blood brain barrier, viral load in cerebrospinal fluid

LISTE DES ABBREVIATIONS

BHE	barrière hémato encéphalique
CAR	<i>coxsackievirus/adénovirus receptor</i>
CIC	contrôle interne compétitif
CV-A, -B	coxsackievirus-A, -B
DAF	<i>decay acceleratating factor</i>
E	echovirus
EV	entérovirus
GMK	cellules “ <i>green monkey kidney</i> ”
HBMEC	cellules “ <i>human brain microvascular endothelial cell</i> ”
HIV	virus de l’immunodéficience humaine
HSV	virus herpes simplex
HTLV	virus T-lymphotropique humain
HUVEC	cellules “ <i>human umbilical vein endothelial cell</i> ”
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	interféron
IL	interleukine
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
KB	cellules “ <i>keratin forming tumor cell</i> ”
LCMV	<i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LCR	liquide céphalo rachidien
MHC	complexe majeur d’histocompatibilité
MMP	<i>matrix metallo protease</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PI4KIII	phosphatidyl inositol-4 phosphate kinase III
PI4P	phosphatidyl inositol-4 phosphate
PPR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSGL1	P-sélectine glycoprotéine ligand-1
PV	poliovirus
PVR	<i>poliovirus receptor</i>
RD	cellules de rhabdomyosarcome
RLR	<i>RIG-like receptor</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SCARB2	<i>scavenger receptor class B, member 2</i>
SIV	virus de l’immunodéficience simienne
SNC	système nerveux central
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
ZO	<i>zonula occuludens</i>

LISTE DES FIGURES ET TABLES

- FIGURE 1.** La poliomyélite dans la haute antiquité
- FIGURE 2.** Relations phylogénétiques entre les entérovirus humains
- FIGURE 3.** Structure de la capsid des entérovirus.
- FIGURE 4.** Organisation du génome des entérovirus.
- FIGURE 5.** Représentation schématique des structures secondaires de la séquence 5' non codante du génome de l'EV-A71.
- FIGURE 6.** Structure de la séquence 3' Non codante des EV-B.
- FIGURE 7.** Exemples de voies de signalisation activées par les entérovirus.
- FIGURE 8.** Mécanisme théorique d'injection du génome des poliovirus dans le cytoplasme par formation de pores membranaires.
- FIGURE 9.** Traduction et maturation des protéines virales.
- FIGURE 10.** Modèle du mécanisme de réplication génomique des EVs.
- FIGURE 11.** Inhibition de la traduction coiffe dépendante par la protéase 2A du poliovirus.
- FIGURE 12.** Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose
- FIGURE 13.** Exemple de nécrose induite.
- FIGURE 14.** Etapes de l'autophagie.
- FIGURE 15.** Formation des structures de réplication génomique du CV-B3.
- FIGURE 16.** Mécanismes génétiques d'évolution des entérovirus.
- FIGURE 17.** Méningites à entérovirus au CHU de Clermont-Ferrand de 1999 à 2013.
- FIGURE 18.** Physiopathologie connue des entérovirus.
- FIGURE 19.** Bulletins d'alerte et d'information émis par l'OMS concernant une flambée de maladie pieds-mains bouche associée à l'EV-A71 au Cambodge en Juillet 2012.
- FIGURE 20.** Le liquide cébrospinal (céphalorachidien).
- FIGURE 21.** Campagne pour l'éradication des derniers foyers de poliomyélite dans le monde
- FIGURE 22.** Cortex cérébral de Souris après administration intra veineuse d'un marqueur Horseradish peroxydase.
- FIGURE 23.** Unité neurovasculaire de la barrière hémato encéphalique.
- FIGURE 24.** Maintien des propriétés de la barrière hémato encéphalique par la sécrétion de facteurs entre les cellules endothéliales et les astrocytes.
- FIGURE 25.** Jonctions intercellulaires endothéliales.
- FIGURE 26.** Modèles *in vitro* de barrière hémato encéphalique.
- FIGURE 27.** Différentes stratégies de franchissement de la barrière hémato encéphalique par des agents pathogènes.
- FIGURE 28.** Principe d'amplification des contrôles internes *versus* la cible dans une PCR en temps réelle basée sur des sondes d'hydrolyses (Taqman™).
-
- Table 1.** Classification des génotypes d'entérovirus humains (www.picornaviridae.com, accès le 29-11-2013)
- Table 2.** Protéines virales et leurs principales fonctions
- Table 3.** Récepteurs cellulaires connus des entérovirus
- Table 4.** Résultats obtenues sur les cellules hCMEC/D3 non polarisées pour les souches entérovirus testées sur pseudo endothelia

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	11
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	15
1. LES ENTEROVIRUS HUMAINS : HISTOIRE ET CLASSIFICATION	16
1.1. Découverte des <i>Enterovirus</i>	16
1.2. Classification des <i>Enterovirus</i>	18
2. Structure des entérovirus	20
2.1. Structure de la capside	20
2.2. Structure du génome des entérovirus	22
2.2.1. Région 5' non codante (5'NC)	22
2.2.2. Cadre ouvert de lecture	24
2.2.3. Région 3' non codante (3'NC)	25
3. Cycle infectieux des entérovirus	27
3.1. Infection de la cellule cible : phase précoce	27
3.1.1. Récepteurs / co-récepteurs connus des entérovirus	27
3.1.1.1. Récepteurs de la superfamille des immunoglobulines	28
3.1.1.2. Récepteurs de la famille des intégrines	29
3.1.1.3. Récepteur DAF (Decay Accelerating Factor, CD55)	30
3.1.1.3. Récepteur SCARB2	30
3.1.1.4. Récepteur PSGL1 (CD162)	30
3.1.2. Induction de voies de signalisation cellulaire	31
3.1.3. Mécanismes d'entrée dans la cellule et de décapsidation	32
3.2. Phase répllicative	34
3.2.1. Traduction du génome viral	34
3.2.2. Réplication du génome viral	35
3.3. Libération extra cellulaire	37
3.3.1. Maturation des provirions	37
3.3.2. Libérations des virions infectieux	37
4. Effets des entérovirus sur la cellule hôte	38
4.1. Modulation de l'expression génique de la cellule infectée	38
4.1.1. Modulation de la transcription cellulaire	38
4.1.2. Modulation de la traduction cellulaire	39
4.1.3. Modulation de la maturation et de l'excrétion des protéines	39
4.2. Modulation de la réponse immunitaire innée	41
4.2.1. Mécanismes	41
4.2.2. Echappement des entérovirus vis-à-vis de l'immunité innée	41
4.3. Modulation de la mortalité cellulaire	42
4.3.1. Mort cellulaire lors de l'infection à EV : apoptose ou nécrose ?	42
4.3.1.1. Mécanismes de l'apoptose	42
4.3.1.2. Mécanismes nécrotiques	44
4.3.1.3. Modulation de l'apoptose et de la nécrose par les entérovirus	45
4.3.2. Mécanisme et modulation de l'autophagie par les entérovirus	46
4.3.2.1. Mécanismes de l'autophagie	46
4.3.2.2. Modulation de l'autophagie par les entérovirus	48
4.4. Remodelage cytoplasmique, génération de l'usine virale	48
4.4.1. Origine et formation des vésicules viro-induites	48
4.4.2. Complexe de réplication membranaire ou « usine virale »	49
5. Evolution des entérovirus	51
5.1. Les mutations	51
5.2. Les événements de recombinaison génétique	51

6. Epidémiologie, physiopathologie des infections à EV	52
6.1. Transmission	52
6.2. Epidémiologie	53
6.3. Physiopathologie générale	53
6.4. Pathologies humaines	54
6.4.1. Les atteintes du système digestif	54
6.4.2. Les infections cutané-muqueuses	55
6.4.2.1. Les Herpangines	55
6.4.2.2. Le Syndrome pieds-mains-bouche	55
6.4.2.3. La conjonctivite hémorragique aigüe	55
6.4.3. Infections respiratoires	55
6.4.4. Les atteintes musculaires	55
6.4.4.1. Atteintes cardiaques	55
6.4.4.2. La pleurodynie	56
6.4.5. Atteintes du système nerveux central (SNC)	57
6.4.5.1. Méningite aseptique	58
6.4.5.2. L'encéphalite	58
6.4.5.3. Myélite et poliomyélite	58
6.5. Voies d'entrée des entérovirus vers le système nerveux	60
6.5.1. Voie neuronale : transport rétrograde axonal	60
6.5.2. Virémie et franchissement de la barrière hémato encéphalique	61
7. La Barrière Hémato Encéphalique	61
7.1. Histoire	61
7.2. Rôle physiologique	63
7.3. Anatomie tissulaire	63
7.3.1. Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales	64
7.3.2. Péricytes	65
7.3.3. Les lames basales	65
7.3.4. Les astrocytes	66
7.3.5. Neurones	67
7.3.6. Cellules immunitaires	67
7.4. Jonctions inter cellulaires	68
7.4.1. Les protéines de jonctions serrées	68
7.4.2. Les protéines de jonctions d'adhérence	69
7.4.4. Rôle du cytosquelette d'actine	70
7.5. Médiation de l'immunité cérébrale	70
7.5.1. Immunité du SNC	70
7.5.2. Rôle immunitaire de la BHE	70
7.5.3. Migration trans-BHE des leucocytes	71
7.6. Systèmes expérimentaux de BHE	71
7.6.1. Modèles animaux	72
7.6.2. Modèle humain <i>ex vivo</i>	72
7.6.3. Modèles <i>in vitro</i>	72
7.6.3.1. Cellules primaires	72
7.6.3.1. Lignées immortalisées	73
7.7. La lignée hCMEC/D3	74
7.7.1. Développement	74
7.7.2. Utilisation	74
7.8. Franchissement de la BHE par les agents pathogènes	75
7.8.1. Processus viraux du franchissement de la BHE	75
7.8.1.1. Franchissement par transcytose	75

7.8.1.2. Mécanisme du cheval de Troie	75
7.8.1.3. Infection de l'endothélium microvasculaire cérébral	75
7.8.2. Hypothèse d'un franchissement de la BHE par les entérovirus	76
7.9. Le tropisme des EVs pour les tissus endothéliaux	77
7.9.1. Cellules endothéliales vasculaires de cœur, de poumon, de foie	77
7.9.2. Cellules endothéliales humaines primaires de la veine du cordon ombilical (HUVEC)	78
7.9.3. Lignées immortalisées de cellules endothéliales humaines microvasculaires de derme (HDMEC)	78
7.9.4. Cellules endothéliales primaires humaines aortiques (HAEC)	78
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	79
MATERIELS ET METHODES	81
Lignées cellulaires	82
Virus	82
Etude prospective de la charge virale et du type EV chez les patients	82
Amorces et sondes	83
RT-PCR quantitative en temps réel des génomes EVs	84
Etude du franchissement d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE par les EVs	84
Mesure de l'étanchéité paracellulaire du modèle <i>in vitro</i> de BHE	85
Tests de viabilité des cellules hCMEC/D3	85
Microscopie à fluorescence	86
Microscopie Electronique	86
Analyses statistiques	87
TRAVAUX ORIGINAUX	89
Développement d'une méthode moléculaire d'analyse et de détection des <i>Enterovirus</i>	91
Etude de la charge virale entérovirus chez les patients présentant une méningite	97
Interaction des EVs avec un modèle cellulaire de barrière hémato-encéphalique	103
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	113
Pathogénie des méningites aiguës et caractéristiques génétiques des entérovirus	114
Atteintes de la BHE lors des infections à entérovirus	115
Franchissement de l'endothélium microvasculaire cérébral par les entérovirus	116
Caractéristiques de l'infection des cellules hCMEC/D3 et relations avec le pouvoir pathogène des entérovirus	117
CONCLUSION GENERALE	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	122
ANNEXES : TRAVAUX ORIGINAUX, ARTICLES & MANUSCRIT	135

INTRODUCTION GENERALE

I must not fear. Fear is the mind-killer. Fear is the little-death that brings total obliteration. I will face my fear. I will permit it to pass over me and through me. And when it has gone past I will turn the inner eye to see its path. Where the fear has gone there will be nothing. Only I will remain.

Dune (1965) Franck Herbert

La plasticité génétique des picornavirus a permis l'émergence de multiples groupes viraux chez un grand nombre d'espèces parmi les vertébrés. Selon le comité international de taxonomie virale (**International Committee on Taxonomy of Viruses : ICTV, 2012**), la famille des *Picornaviridae* regroupent 17 genres viraux : *Aphtovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, ***Enterovirus***, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* et *Tremovirus*. A titre d'exemple nous pouvons citer le virus FMDV (Foot and Mouth Disease Virus, Aphtovirus) responsable d'épidémies de fièvre aphteuse chez les animaux d'élevage, le virus EMCV (EncephaloMyoCarditis Virus) chez les rongeurs (genre *Cardiovirus*), des virus équins, porcins ou encore simiens dont les pathologies associées ne sont pas connues. Parmi les *Picornaviridae*, on recense aussi plusieurs genres dans lesquels sont classés des virus humains. Celui des *Hepatovirus* comprend un seul type pathogène chez l'homme, le virus de l'hépatite A (HAV). Le genre des *Parechovirus* comprend 12 génotypes, dont le type 3 est reconnu depuis quelques années seulement comme agent responsable d'infections neuro-méningées chez le jeune enfant [**Han et al., 2013**]. Il n'y a pas de genre qui regroupe des virus d'origine exclusivement humaine, à l'exception du genre *Hepatovirus*. Le genre *Parechovirus*, par exemple, contient aussi le virus Ljungan isolé chez certains mammifères aquatiques.

C'est aussi le cas du genre *Enterovirus*. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux entérovirus humains « historiques » hormis les rhinovirus qui depuis 2008 sont classés dans ce genre sur la base de leur parenté génétique. Dans la suite de l'exposé, le terme entérovirus (EV) désignera les différents types d'EV humains que nous avons étudiés, qui ont été inclus dans les espèces taxonomiques A, B, C et D (EV-A à EV-D). La diversité des EVs est connue depuis qu'ils ont pu être obtenus en culture *in vitro* et différenciés par la technique de séroneutralisation, c'est-à-dire depuis la fin des années 1940, lorsque l'on s'est aperçu que des virus isolés de selles d'enfants de la ville de Cocksackie (Etats-Unis) présentant une poliomyélite paralytique, ne pouvaient pas être neutralisés par les antisérums contre les poliovirus. La séroneutralisation a amené une première vague de sérotypes jusque dans les années 1980, puis les techniques de typage moléculaire ont pris le relais et ont amené une seconde vague de nouveaux EVs. L'analyse des génomes et les techniques d'identification multi locus ont ensuite permis montrer que la recombinaison génétique et les mutations favorisaient l'émergence de virus variants à l'intérieur de chaque génotype [**Mirand et al., 2007 ; Bailly et al., 2009 ; Bailly et al., 2011**].

Les EVs non poliomyélitiques sont une cause importante de morbidité dans le monde. Ils sont associés à des atteintes digestives, musculaires, cardiaques, respiratoires, cutanées et muqueuses, mais les pathologies les plus inquiétantes sont la conséquence d'infections neurologiques ou

méningées. L'expression clinique neuro-méningée la plus fréquente et spontanément résolutive est la méningite aiguë [**Abzug, 2013 ; Chadwick, 2006**]. Les manifestations cliniques graves sont rares et sont la conséquence d'infections cérébrales (paralysie flasque, encéphalite).

La première partie de cette thèse a porté sur la pathogénie des infections neuro-méningées causées par les EVs. Nous avons validé une technique de RT-PCR quantitative « maison », afin de l'utiliser au cours d'une étude prospective de 5 ans pour déterminer la charge virale des EVs dans le LCR. Dans la seconde partie, nous avons exploré l'hypothèse d'un franchissement de la barrière hémato encéphalique en tant que voie d'accès commune à une majorité d'EVs vers le système nerveux central. Nous avons utilisé comme modèle la lignée cellulaire endothéliale microvasculaire cérébrale humaine (hCMEC/D3) [**Weksler *et al.*, 2005**].

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Presque toujours la discipline est cachée, faite pour limiter et non pour libérer. N'en cherchez pas le pourquoi. Méfiez-vous du comment. Inexorablement, le pourquoi mène au paradoxe et le comment vous enferme dans le piège d'un univers de cause et d'effet.

Les hérétiques de Dune (1984) Franck Herbert

1. LES ENTEROVIRUS HUMAINS : HISTOIRE ET CLASSIFICATION

1.1. Découverte des entérovirus

L'histoire de la découverte des EVs humains est intimement liée au développement et à l'évolution des techniques de virologie. Comme pour de nombreux virus, leur histoire débute par une pathologie inspirant une peur collective, qui entraîna la recherche d'un traitement. Cette première pathologie associée aux EVs fut la poliomyélite. La poliomyélite semble connue depuis l'antiquité : des gravures d'un bas relief égyptien datant de la XVIIIe dynastie (1403-1365 av. JC) montrent un homme s'appuyant sur une béquille, qui présente une amyotrophie du membre inférieur droit typique de séquelles poliomyelitiques (**figure 1**). Cependant ce n'est qu'au début du XXe siècle avec l'émergence d'importantes épidémies de poliomyélites en Europe et aux USA, ainsi qu'avec l'apparition des sciences microbiologiques, que débutèrent des recherches concernant l'étiologie de cette maladie. L'historique qui suit est extrait de la revue de **Joseph L. Melnick (1996)**.

En 1908 à Vienne, Landsteiner isole le poliovirus en reproduisant les manifestations cliniques de la poliomyélite sur des singes par inoculation de l'agent ultra filtrable de la maladie. En 1936, Sabin et Olitsky réalisent la première culture *in vitro* de poliovirus à partir de tissus nerveux embryonnaires humains. Puis en 1949, Enders étend la culture du poliovirus à des tissus non nerveux. En 1955, un vaccin antipoliomyélitique à virus inactivé est mis au point par Salk, puis en 1965 un second vaccin à virus atténué est développé par Sabin. Rapidement, avec l'essor des techniques de virologie, il apparait que le poliovirus fait partie d'un groupe beaucoup plus important de virus. En 1948, Dallford et Sickles qui travaillaient sur des souriceaux nouveau-nés comme modèle d'étude de la poliomyélite, isolent les premiers coxsackievirus. Puis dans le courant des années 50, de nouveaux virus distincts à la fois des poliovirus et des coxsackievirus sont isolés sur différents continents, à partir de prélèvements de patients sains ou souffrants de méningites. Ces nouveaux virus ne semblant pas associés à une maladie furent baptisés ECHOvirus (Enteric Cytopathogenic Human Orphan, ci-après echovirus). En 1955, un comité de recherche est formé pour étudier les echovirus. En 1957, comprenant que les ECHO, polio et coxsackievirus forment un seul groupe viral, le comité de recherche définit le genre *Enterovirus* (**Committee on the Enteroviruses, 1957**). La liste des EVs ne cessera de croître au cours des cinquante dernières années, avec une nette accélération à partir des années 80 suite à l'essor des techniques de biologie



FIGURE 1. La poliomyélite dans la haute antiquité.

Stèle égyptienne représentant un homme s'appuyant sur une béquille avec une amyotrophie de la jambe droite, typique de séquelle de poliomyélite. (Source: **Organisation Mondiale de la Santé**)

moléculaire, d'analyse génomique et de l'informatique. Aujourd'hui les EVs comptent plus de 200 types différents, rhinovirus inclus.

1.2. Classification des entérovirus

Les EVs appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. Le terme *Picornaviridae* est issu de l'acronyme Pico (du grec ancien : petit), ARN (en. RNA) et virus (petit virus à ARN). Cette famille virale est l'une des plus diversifiée et compte parmi les plus petits pathogènes humains et animaux connus (20 à 30 nm de diamètre). Les picornavirus se définissent comme des virus non enveloppés, leur capsidie icosaédrique protège un génome infectieux d'ARN monocaténaire de polarité positive et non segmenté.

Le genre *Enterovirus* regroupe 4 espèces (A à D) de virus humains et simiens, 5 espèces (E à H et J) de virus animaux et les 3 espèces (A à C) de rhinovirus humains (HRV). On retrouve actuellement parmi les EV-A : 11 génotypes de coxsackievirus A et 9 génotypes d'entérovirus. Pour les EV-B : 1 génotype de coxsackievirus A, 6 génotypes de coxsackievirus B, 28 génotypes d'échovirus et 24 génotypes d'entérovirus. Pour les EV-C : les 3 génotypes de poliovirus, 9 génotypes de coxsackievirus A et 11 génotypes d'entérovirus. L'espèce des EV-D ne compte que 4 génotypes d'entérovirus (**figure 2 et table 1**).

La classification récente des EVs a été établie par typage moléculaire et est basée sur le séquençage du gène 1D codant la protéine de capsidie VP1. Le type d'EV est ensuite identifié par l'analyse de la séquence 1D avec la méthode Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) et par analyse phylogénétique généralement avec la méthode Neighbor Joining. Deux souches sont considérées comme homotypiques (de même génotype) si leurs séquences nucléotidiques présentent plus de 75% de similitude. [Oberste *et al.*, 1999 ; Caro *et al.*, 2001 ; Mirand *et al.*, 2006]. Plus rapide, plus sensible et pouvant mieux appréhender les variations antigéniques, le typage moléculaire des EVs a progressivement supplanté la technique d'identification par séroneutralisation. Initialement, les EVs étaient typés par neutralisation de leur pouvoir infectieux en culture cellulaire à l'aide de pools d'antisérum de sérotypes spécifiques développés par Lim et Benyesh-Melnick (1960). Malgré le remplacement de cette technique par le typage moléculaire, les génotypes ont gardé pour la plupart leurs anciennes terminologies (echovirus ou coxsackievirus). Les nouveaux génotypes identifiés uniquement par typage moléculaire portent tous le nom d'entérovirus et sont suivis d'un numéro indiquant l'ordre chronologique de leur identification.

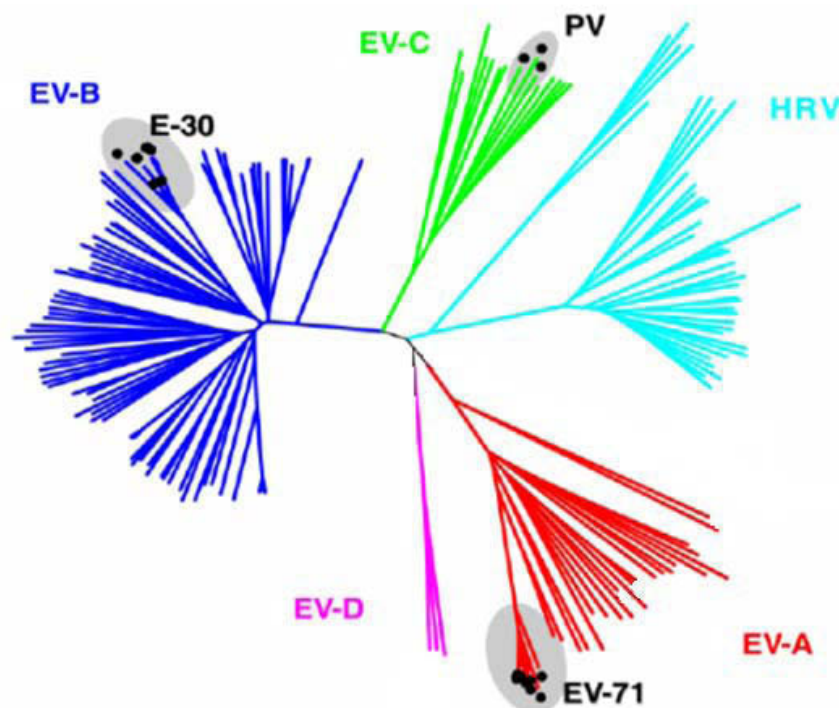


FIGURE 2. Relations phylogénétiques entre les entérovirus humains.

Arbre phylogénétique construit par la méthode de Neighbor-Joining à partir des séquences 1D de différentes souches et génotypes d'EV humain. Les entérovirus de l'espèce A (EV-A) sont en rouge, l'espèce B (EV-B) en bleu, l'espèce C (EV-C) en vert et l'espèce D (EV-D) en violet. Les rhinovirus sont représentés en cyan. Abréviations : poliovirus (PV), entérovirus 71 (EV-71) et echovirus 30 (E-30). (Source: **laboratoire de virologie Clermont-Ferrand**).

Table 1. Classification des génotypes d'Entérovirus humains (www.picornaviridae.com, accès le 29-11-2013)

Espèce	Genotypes
A	CV-A 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16
	EV-A 71, 76, 89, 90, 91, 114, 119
B	CV-A 9
	CV-B 1, 2, 3, 4, 5, 6
	E 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33
	EV-B 69, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, 111
C	PV 1, 2, 3
	CV-A 1, 11, 13, 17, 19, 20, 21, 22, 24
	EV-C 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116, 117, 118
D	EV-D 68, 70, 94, 111

Abbreviations: CV: Coxsackievirus, EV: Entérovirus, E: Echovirus, PV: Poliovirus

Les génotypes en gras représentent ceux inclus aux études présentées dans ce mémoire

2. Structure des entérovirus

2.1. Structure de la capside

La capside des EVs présente la structure d'un icosaèdre d'environ 30 nm, elle est formée de 60 protomères, chacun constitué d'un exemplaire des 4 protéines structurales, VP1, VP2, VP3 et VP4. Sa structure tridimensionnelle et les interactions qu'elle établit avec des récepteurs cellulaires ont été résolues pour un certain nombre d'EVs par cristallographie. Malgré des différences dans les séquences en acides aminés et des subtilités structurales d'un type ou d'un genre (**figure 3**), l'architecture de la capside est fondamentalement conservée [**Racianello, 2006**].

Les protéines VP1, VP2 et VP3, qui constituent la surface de la capside, possèdent une organisation commune de 8 feuillets β antiparallèles formant une structure dite en tonneau ou « jelly roll » (gâteau roulé, *en.*). L'association des différentes protéines est assurée par des interactions entre leurs extrémités N-terminales et par la protéine VP4 qui est positionnée à l'intérieur de la capside et contribue à sa stabilité structurale et son interaction avec le génome viral (**figure 3**). Les boucles peptidiques exposées à la surface des protéines VP1, VP2 et VP3 sont les régions les plus variables de la capside. Elles forment différents reliefs dont la topologie définit la reconnaissance des récepteurs cellulaires et expose les épitopes viraux. La zone de jonction entre les protomères au niveau de VP1 forme un plateau proéminent « mesa » en étoile à 5 branches, entourée de dépressions « canyons ». Ces dépressions abritent pour certains EVs, comme le PV ou le CV-A21, les sites de fixation de différents récepteurs cellulaires de la superfamille des immunoglobulines [**Belnap et al., 1999 ; Xiao et al., 2005**]. Pour d'autres EVs comme l'EV-A71, le « canyon » n'est pas assez profond pour permettre la fixation d'un récepteur. D'autres récepteurs n'appartenant pas à la super famille des immunoglobulines, comme le ligand 1 de la P-selectine, peuvent se fixer au niveau de deux régions formées par VP2 et VP3. La bordure sud du « canyon » est formée d'une boucle particulièrement proéminente de VP2, appelée « Puff », et des boucles de VP3 forment une importante protrusion appelée « knob » [**Plevka et al., 2012**]. L'interaction des récepteurs cellulaires avec la capside va entraîner la fixation, l'internalisation et la déstabilisation de la capside, processus qui permettront la libération cytoplasmique du génome viral (**voir § 3.1.3.**).

Les EVs sont des virus non enveloppés. La capside forme une véritable armure qui protège le génome viral aussi bien de l'environnement acide du tube digestif que de l'environnement extérieur. Cette propriété explique également leur résistance aux solvants des lipides (alcool à 70°, éther et chloroforme), aux désinfectants et aux acides faibles. Les EVs sont cependant thermolabiles

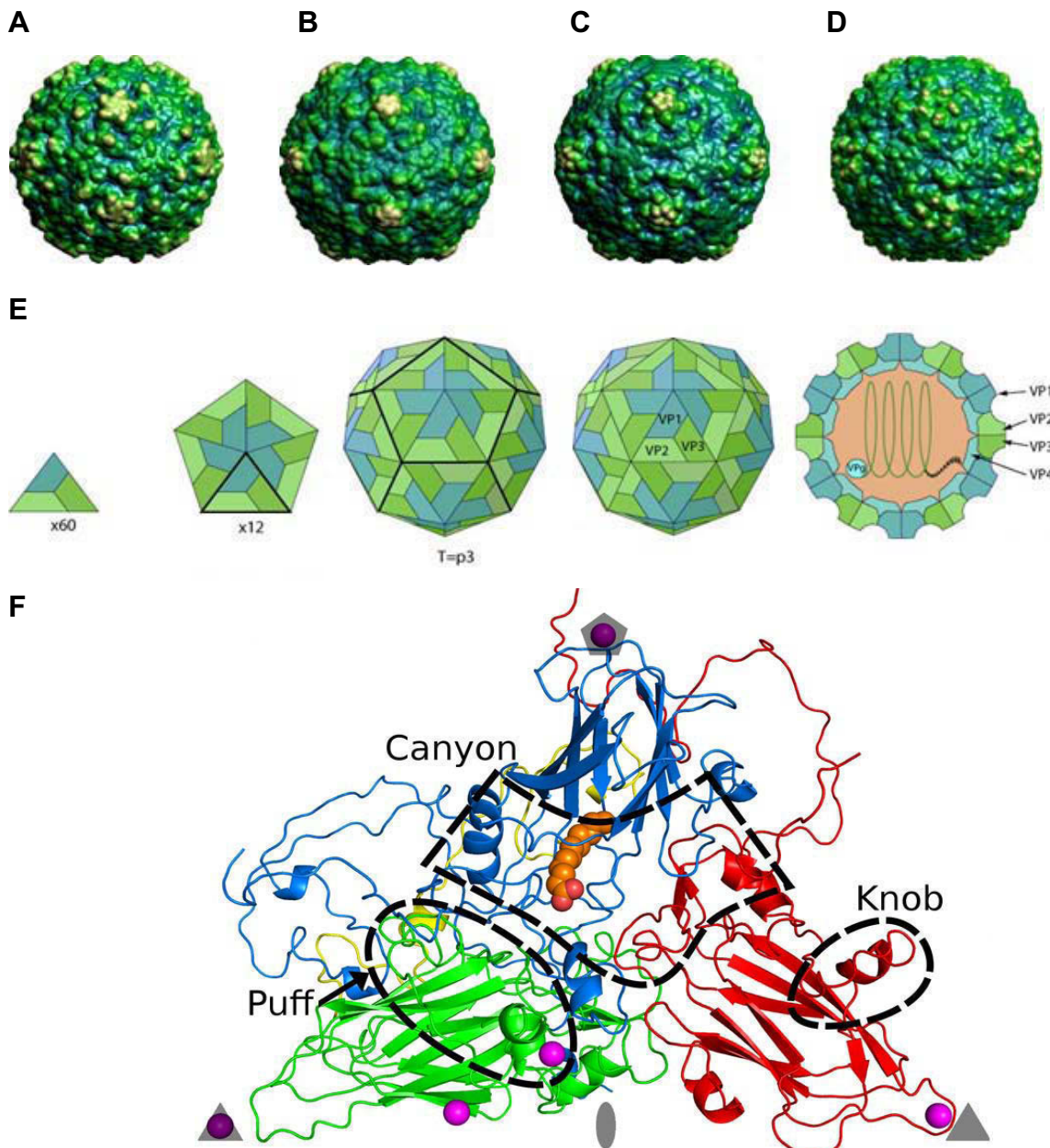


FIGURE 3. Structure de la capside des entérovirus.

Représentation tridimensionnelle des capsides du poliovirus-1 (A), du coxsackievirus B3 (B), de l'échovirus 11 (C) et de l'EV-A71 (D). (Source : VIPERdb <http://viperdb.scripps.edu/>)

La capside est formée de 60 protomères constitués chacun d'un exemplaire des protéines de structure VP1-4. Cinq protomères forment un pentamère et 12 pentamères forment une capside. Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne (E). (Source : Swiss Institut of Bioinformatique 2008).

Diagramme d'un protomère d'EV-A71 montrant les différentes protéines de capside VP1 (bleu), VP2 (vert), VP3 (rouge), VP4 (jaune). Les positions caractéristiques de la surface de la capside : le canyon, le puff et le knob, sont indiquées par des pointillés (d'après Plevka *et al.*, 2012) (F).

à 50°C et sensibles au formol, à la glutaraldehyde, à l'hypochlorite de sodium (Javel) et aux acides forts. [Melnick, 1996 ; Chambon *et al.*, 2004].

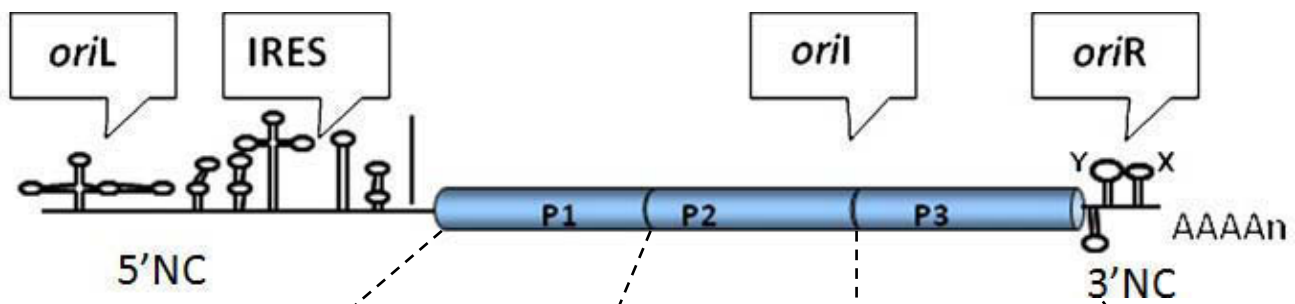
2.2. Structure du génome des entérovirus

Le génome des EVs est un ARN monocaténaire, de polarité positive, non segmenté et infectieux, c'est-à-dire pouvant être directement traduit. La structure primaire, l'organisation génique et l'expression du génome des EVs fut décrite pour la première fois par **Kitamura *et al.* (1981)** à partir de la souche Mahoney du PV-1. Puis assez vite, d'autres types seront décrits, *eg.* extraits de genbank (NCBI) : coxsackievirus B3 [Lindberg *et al.*, 1987], entérovirus 71 [Brown & Pallansch, 1995], echovirus 30 [Zell *et al.*, 1999 non publié]. L'organisation génomique décrite chez les poliovirus est globalement conservée parmi les picornavirus, malgré des différences de taille et de séquence, mais les EVs ne présentent pas de séquence codant une protéine « Leader » en 5' de leur génome. Le génome des EVs a une longueur d'environ 7500 nucléotides (**figure 4**). Il ne contient qu'un seul cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de 2 régions non codantes. La région située en 5' (environ 750 nucléotides), dépourvue de coiffe, est associée à une petite protéine virale VPg (3B) qui après clivage donnera un ARN pouvant être traduit. La région en 3' d'environ 300 nucléotides est terminée par une queue poly adénylée [Raccianello, 2006].

2.2.1. Région 5' non codante (5'NC)

Cette région du génome est caractérisée par 6 structures secondaires (I à VI) en tige boucle (stem-loop) consécutives aux repliements de l'ARN (**figure 5**). La première structure, qui a la conformation d'une feuille de trèfle « cloverleaf » porte un élément multifonctionnel Ori L. Cet élément Ori L intervient en association avec la région 3'NC dans la traduction et la réplication du génome viral [Gamarnik et Andino., 1998 ; Zoll *et al.*, 2009]. Les structures (II à IV) forment un site d'initiation interne de la traduction (IRES), qui va amarrer les ribosomes sur l'ARN viral et différents inducteurs cellulaires de la traduction [Ohlmann *et al.*, 1996 ; Kempf et Barton., 2008a ; 2008b]. Cette région IRES est obligatoire pour la traduction du génome viral à cause de l'absence de coiffe en 5' [Pelletier et Sonenberg, 1989]. L'importance fonctionnelle de cette région 5'NC explique la présence de séquences nucléotidiques hautement conservées parmi les EVs. Grâce à cette conservation de séquence, des amorces oligonucléotidiques ont pu être dessinées et utilisées pour réaliser le diagnostic positif des infections à EV par RT-PCR [Rotbart *et al.*, 1990].

A



B

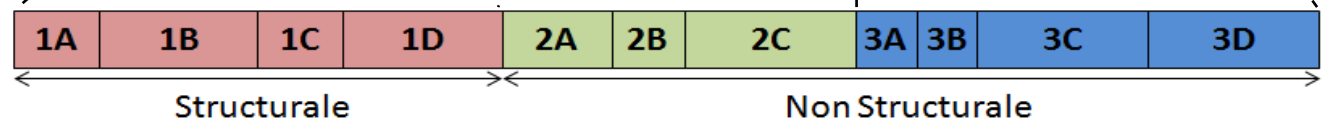


FIGURE 4. Organisation du génome des entérovirus.

Le cadre ouvert de lecture est composé des segments génomiques P1, P2 et P3 et il est borné par 2 séquences non codantes (NC) en 5' et 3'. Les séquences 5' et 3'NC, sont impliquées dans la traduction (IRES) et la réplication du génome viral (ORI). Elles se caractérisent par la présence de repliements secondaires de l'ARN (d'après **Zoll *et al.*, 2009**) (A). Le segment P1 code les protéines de la capside dans l'ordre VP4, VP2, VP3 et VP1 ; Les segments P2 et P3 codent des protéines non structurales impliquées dans la réplication du génome viral (polymérase 3D), la maturation des protéines virales (protéases 3C et 2A) et interfèrent avec le métabolisme cellulaire (B).

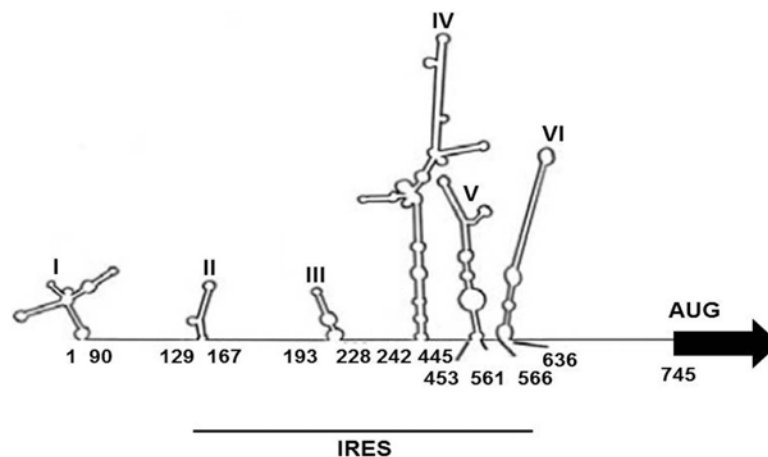


FIGURE 5. Représentation schématique des structures secondaires de la séquence 5' non codante du génome de l'EV-A71.

Les 6 structures secondaires en tige boucle sont notées en chiffres romains de I à VI. Le premier et le dernier nucléotide de chaque structure ainsi que le codon initiateur (AUG) sont indiqués. La région d'initiation interne de la traduction (IRES) est soulignée.

(Source : www.sinobiological.com/Biological-Characteristics-of-Enterovirus-71-EV71-a-6404.html)

2.2.2. Cadre ouvert de lecture

Le cadre ouvert de lecture (ORF) code une polyprotéine d'environ 250 kDa, qui après un clivage autocatalytique donnera 11 protéines virales (**table 2**). Le cadre ouvert de lecture se subdivise en 3 régions P1, P2 et P3 [**Raccianello, 2006**]. La région P1 code les quatre protéines structurales composant la capsid virale : dans l'ordre VP4, VP2, VP3 et VP1. La région P2 code trois protéines non structurales : 2Apro, 2B et 2C. La région P3 code quatre protéines non structurales 3A, 3B (VPg), 3Cpro et 3Dpol.

- 2Apro et 3Cpro sont des protéases impliquées dans la maturation par clivage de la polyprotéine virale et dans la modulation des mécanismes métaboliques de la cellule hôte. La protéase 2Apro intervient aussi dans la régulation de la réplication du génome viral [**Jurgens *et al.*, 2006**].
- 2B, 2C et 3A sont des protéines hydrophobes s'associant aux membranes des organites cellulaires. Elles agissent comme perturbateurs et inhibiteurs des voies métaboliques. Ces protéines interviennent également dans la réplication du génome en induisant la formation de structures vésiculaires issues des membranes intracellulaires, qui servent de plateforme répliquative. D'une manière concentration dépendante, elles stimulent la synthèse de l'antigénome (ARN négatif), qui servira de matrice pour la synthèse de génomes viraux (ARN positifs).
- 3Dpol présente une fonction ARN polymérase ARN dépendante assurant la réplication du génome viral. Elle est dépourvue d'activité éditrice et peut changer de matrice au cours de l'élongation du génome. Elle constitue le principal moteur de la variabilité génétique des EVs (**voir § 5.1. et 5.2.**). Son intermédiaire 3CDpro va induire un changement dans l'utilisation du génome viral en stoppant sa traduction pour initier sa réplication (**voir § 4.1.**).
- 3B (aussi dénommée VPg) est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome viral. Sous sa forme poly uridylée VPg-pUpU, elle participe à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase 3D (**voir § 3.2.2.**).

Le cadre ouvert de lecture présente également un élément *cis* régulateur de la réplication du génome viral (séquence CRE ou Ori I). Cet élément forme une structure ARN secondaire en tête d'épingle « hairpin » au sein de la région P2. Il sert de matrice pour l'uridylation de la protéine VPg [**Zoll *et al.*, 2009**].

2.2.3. Région 3' non codante (3'NC)

Cette région terminée par une queue poly adénylée est de taille variable selon les génotypes d'EVs (**figure 6**). Elle présente comme pour la région 5'NC différents repliements complexes de l'ARN. La conformation globale des repliements secondaires en tige boucle « stem-loop » forme une structure en L. Deux tiges-boucles X et Y, dont la longueur des **tiges** est hautement conservée (8 et 12 paires de bases respectivement), forment au niveau de leurs **boucles** des interactions ARN tertiaires par un mécanisme de « pseudoknot » ou « kissing ». Cette organisation spatiale tertiaire forme un élément *cis* régulateur Ori R. L'élément Ori R est impliqué dans la synthèse de l'antigénome (polarité négative), qui sert de matrice pour la réplication du génome (polarité positive). L'activité de l'élément Ori R nécessite une connexion avec l'élément Ori L situé dans la région 5' (NC) *via* la circularisation du génome viral par un pont protéique [Pilipenko *et al.*, 1992 ; 1996 ; Herold et Andino, 2001 ; Zoll *et al.*, 2009].

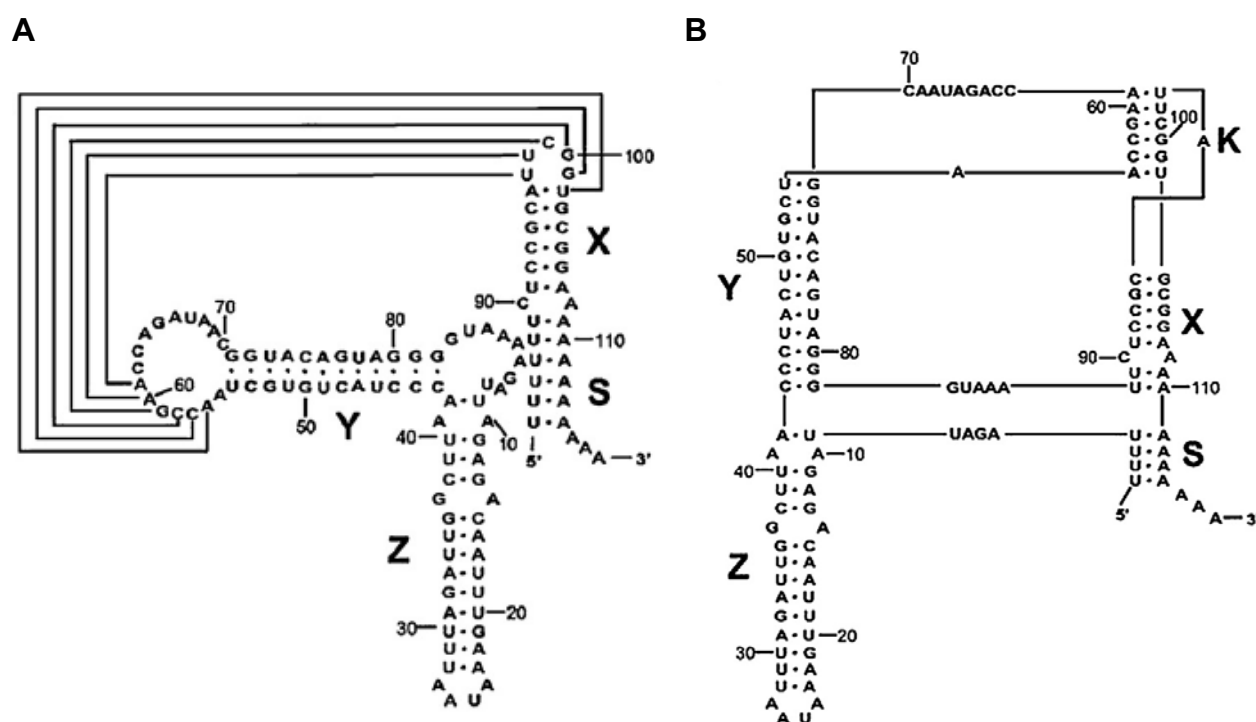


FIGURE 6. Structure de la séquence 3'Non codante des EV-B.

Structure secondaire de l'ARN 3'non codant avec les domaines X, Y et Z. Les interactions ARN par un mécanisme de « pseudoknot » ou « kissing » sont désignées par les connecteurs entre les boucles X et Y (A). Structure tertiaire de l'ARN 3'non codant résultante de l'interaction entre les boucles X et Y (B). (D'après Zoll *et al.*, 2009).

Table 2. Protéines virales et leurs principales fonction

Protéines	Fonctions
VP1 - VP4	Protéines de capside Tropisme cellulaire
2Apro	Protéase Clivage de la polyprotéine virale Inhibition de la traduction cellulaire Promotion et stabilité de la traduction virale Stimulation de la synthèse de l'antigénome Interférence dans l'immunité innée intracellulaire
2BC	Inhibition du transport vésiculaire Induction de processi d'autophagy-Like Réorganisation membranaire et formation de vésicules Perméabilisation membranaire
2B	Inhibition du transport vésiculaire Induction de processi d'autophagy-Like Réorganisation membranaire et formation de vésicules Perméabilisation membranaire
2C	Inhibition du transport vésiculaire Effecteur de la réplication du génome viral
3AB	Association du complexe de répliation viral aux membranes
3A	Inhibition du transport vésiculaire Induction de processi d'autophagy-Like Réorganisation membranaire et formation de vésicules Association du complexe de répliation viral aux membranes
VPg (3B)	Après polyuridylation sert d'amorce à la réplication du génome viral
3CD	Clivage de la polyprotéine virale Stimulation de la réplication du génome virale
3C	Clivage de la polyprotéine virale Arrêt de la transcription cellulaire Interférence dans l'immunité innée intracellulaire Clivage de facteurs cellulaires
3Dpol	ARN polymérase ARN dépendante polyuridylation de VPg Réplication du génome viral

Table 3. Récepteurs cellulaires connus des Entérovirus

Nature	Récepteur	Virus	Références	Co-récepteur connu
Famille immunoglobulines	PVR (CD155)	PV-1, -2 et -3	Mendelsohn et al., 1989	
	ICAM-1 (CD54)	CV-A11, A13, A18, A20 et A21 CV-A21	Colombo et al., 1986; Newcombe et al., 2003 Shafren et al., 1997	DAF (CD55)
	CAR (HCAR ou CXADR)	CV-B1, B2, B3, B4, et B5	Bergelson et al., 1997 Shafren et al., 1995; Bergelson et al., 2002	DAF (CD55) pour CV-B1, B3 et B5
Facteur du complément	DAF (CD55) *	E3, 7, 11, 12, 13, 20, 21, 29, 33	Ward et al., 1994; Bergelson et al., 1995	αVβ3 pour E11
		E6, 19, 24, 25 et 30 (interaction faible) EV70	Powell et al., 1998 Alexander et Dimock, 2002	αVβ3 pour E25 et E30
Intégrines	αVβ3	E11, 25 et 30 CV-A9 *, E7 *, 9 *, et 32 *	Ylipastoo et al., 2010	DAF (CD55)
	αVβ6	CV-A9	Heikkilä et al., 2009	DAF (CD55) pour E7 ; αVβ6 pour CV-A9
	α2β1	E1 et 8	Bergelson et al., 1993	αVβ3
Effecteur voie endolysosomale	SCARB2	CV-A7, A14, A16 et EV-A71	Yamayoshi et al., 2012	PSGL1 pour EV-A71
Molécule d'adhésion cellulaire	PSGL1	EV-A71	Yamayoshi et al., 2013	SCARB2

* Seul une fixation du virus sur le récepteur à été montrée

3. Cycle infectieux des entérovirus

Le cycle cellulaire des EVs est exclusivement cytoplasmique et peut se décliner en 3 phases successives.

- **Une phase précoce**, qui comprend la fixation du virus à la surface d'une cellule hôte, son entrée et la libération du génome dans le cytoplasme. La transfection du génome infectieux des EVs est suffisante pour initier une réplication virale dans tout type cellulaire permissif. Cette phase précoce constitue donc une étape clef pour déterminer le tropisme cellulaire.
- **Une phase répllicative**, au cours de laquelle le génome viral est traduit et répliqué, et de nouvelles particules infectieuses sont assemblées. Cette phase constitue le cœur du cycle viral. Elle se traduit par de profondes modifications de la morphologie et de l'organisation intra cellulaire, que l'on nomme effet cytopathique (ECP). Ces modifications induites par les protéines virales, génèrent un environnement cellulaire propice à la multiplication virale (**voir § 4.4.**).
- **Une phase de libération**, au cours de laquelle les nouvelles particules virales sont libérées de la cellule infectée. Cette phase peut sembler anodine au premier abord, mais elle représente une étape cruciale. Si le cycle viral condamne à terme la cellule hôte (directement ou indirectement), il est impératif pour le virus de s'en libérer pour pouvoir infecter une nouvelle cellule et débiter un nouveau cycle.

3.1. Infection de la cellule cible : phase précoce

Les EVs n'infectent que les cellules à la surface desquelles la particule virale peut être fixée puis internalisée. L'attachement du virus sur la cellule cible se produit lorsque des structures de la capsid virale (boucles ou cavités) interagissent avec un (ou des) récepteur(s) spécifique(s) de la cellule (**voir § 2.1.**). Cette interaction induit une voie de signalisation intracellulaire et va initier l'internalisation du virus et la déstabilisation de la capsid, ce qui permet la sortie du génome viral hors de la capsid dans le cytoplasme.

3.1.1. Récepteurs / co-récepteurs connus des EV

Les EVs sont susceptibles de recruter une large gamme de récepteurs membranaires (**table 3**). Certains sont spécifiques à un petit nombre d'EVs, d'autres à l'inverse semblent ubiquitaires et utilisés par de nombreux génotypes. Certains EVs interagissent également avec un co-récepteur pour potentialiser leur entrée dans la cellule. Le rôle du co-récepteur (ou récepteur d'attachement)

est principalement de concentrer les particules virales à la surface des cellules, faciliter la fixation au récepteur et induire une signalisation intra cellulaire.

3.1.1.1. Récepteurs de la superfamille des immunoglobulines

☑ Récepteur PVR (CD155)

Le récepteur CD155 ou PVR est le récepteur spécifique des 3 géotypes de poliovirus. Il fut mis en évidence par la transfection de son ADN à des cellules murines non sensibles aux poliovirus [Mendelsohn *et al.*, 1989]. Le récepteur PVR est une protéine transmembranaire de 80 kDa composée de 3 domaines extracellulaires de type immunoglobulines, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C terminal cytoplasmique. La liaison avec les poliovirus est réalisée sur le premier domaine extracellulaire [Koike *et al.*, 1991]. Le rôle physiologique du récepteur PVR est de participer à des mécanismes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire. Il est exprimé par différents types de cellules, dont une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (voir § 7.8.2.) [Coyne *et al.*, 2007 ; 2011].

☑ Récepteur « Inter Cellular Adhesion Molecule 1 » ICAM-1 (CD54)

La molécule de surface ICAM-1 est le récepteur spécifique de différents EVs de l'espèce C, plus particulièrement CV-A13, A11 (ex-A15), A18, A20 et A21 [Colunno *et al.*, 1986 ; Shafren *et al.*, 1997 ; Newcombe *et al.*, 2003]. Initialement, il fut caractérisé comme un récepteur des Rhinovirus par un anticorps qui avait la propriété de protéger les cellules Hela contre l'infection. Il s'avéra que ce même anticorps protégeait également ces cellules d'une infection par des souches de CV-A13, A18 et A21, mais il ne les protégeait pas contre une infection par d'autres EVs – poliovirus, CV-B2, CV-B3, E-1 et E-6 [Colunno *et al.*, 1986]. L'antigène cible de cet anticorps, la molécule ICAM-1, fut ensuite identifiée. Dans le cas particulier du CV-A21, le récepteur ICAM-1 agit en synergie avec le co-récepteur DAF (CD55), qui semble optimiser la fixation de la particule sur la membrane [Shafren *et al.*, 1997]. La molécule ICAM-1 est typiquement exprimée à la surface de l'endothélium quiescent de plusieurs tissus, en l'absence d'état inflammatoire. Son rôle physiologique est de fixer l'intégrine LFA-1 présente sur les leucocytes. Les lymphocytes activés se lient aux cellules endothéliales *via* ICAM-1, puis transmigrent à travers la barrière endothéliale (voir § 7.5.2. et 7.5.3.). La molécule ICAM-1 est largement exprimée à la surface des cellules endothéliales des petits vaisseaux des villosités du plexus choroïde, des veinules du stroma choroïdal et des veinules post-capillaires dans les méninges, ce qui en fait un acteur majeur de l'entrée des lymphocytes T dans le liquide cébrospinal [Kivisäkk *et al.*, 2003].

☑ Récepteur CAR (aussi dénommé : HCAR, CXADR)

Le récepteur CAR pour « Coxsackievirus Adenovirus Receptor » est un récepteur commun aux adénovirus et aux 6 géotypes CV-B. Il fut mis en évidence par la sensibilisation de cellules CHO, normalement non susceptibles à ces virus, par la transfection du gène du récepteur CAR [Bergelson *et al.*, 1997]. Le récepteur CAR est impliqué à la fois dans la fixation et l'internalisation des CV-B. La fixation des virions au récepteur CAR est optimisée par l'action conjointe du co-récepteur DAF. Cette optimisation jouerait notamment un rôle au niveau des cellules épithéliales intestinales, là où CAR est particulièrement inaccessible, car localisée dans les jonctions serrées [Shafren *et al.*, 1995 ; Shieh et Bergelson., 2002]. Le récepteur CAR participe à des mécanismes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire. C'est une protéine des jonctions serrées, localisée dans les tissus épithéliaux [Shieh et Bergelson., 2002], les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales [Coyne *et al.*, 2011], le cœur et le système nerveux central pendant son développement.

3.1.1.2. Récepteurs de la famille des intégrines

☑ Intégrine $\alpha V\beta 3$ (récepteur à la vitronectine)

L'intégrine $\alpha V\beta 3$ fixe plusieurs EVs de l'espèce B, dont le CV-A9 et les E-7, 11, 25, 30, et 32, à la surface de cellules primaires β d'îlots pancréatiques et de la lignée GMK. Son rôle exact dans l'infection par les EVs reste encore méconnu et semble à la fois virus et cellule dépendant. Des tests de neutralisation de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ ont montré une protection des cellules GMK (Green Monkey Kidney) contre une infection par les six virus ci-dessus. Des cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC) sont protégées d'une infection par les types CV-A9, E25, E30 et E32, et les voies d'internalisation employées par ces EVs sont différentes. Une inhibition de l'internalisation *via* des radeaux lipidiques par la nystatine réduit la proportion de cellules GMK infectées uniquement par les types E11, E25 et E30. Une inhibition de l'endocytose dépendante des clathrines par la chlorpromazine n'a pas d'effet sur les six virus [Ylipastoo *et al.*, 2010]. Cette variabilité associée à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ suggère l'implication de co-récepteurs. D'autres récepteurs peuvent aussi être recrutés par ces EVs, par exemple la molécule DAF (E-7 et E-11) ou l'intégrine $\alpha V\beta 6$ (CV-A9).

☑ Intégrine $\alpha V\beta 6$

L'intégrine $\alpha V\beta 6$ est un autre récepteur recruté par le CV-A9. Une étude réalisée avec des cellules RD (Rhabdomyosarcome humain) et A549 (Adénocarcinome humain, épithélium alvéolaire), a montré que les virions présentent une avidité comparable pour les intégrines $\alpha V\beta 6$ et $\alpha V\beta 3$, mais que l'affinité est meilleure pour $\alpha V\beta 6$ [Heikkilä *et al.*, 2009].

☑ Intégrine $\alpha 2\beta 1$ (récepteur VLA-2)

L'E-1 se fixe spécifiquement à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, plus particulièrement au niveau de la sous unité $\alpha 2$. Des tests de neutralisation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par un anticorps spécifique protègent les cellules Hela de l'infection par l'E-1, mais pas contre l'infection par les echovirus types 2 à 7, 9, 11 à 13, 17 à 19, 21, 22, 25 à 27, 29 et 30. La transfection CHO du gène de la sous unité $\alpha 2$ à des cellules non permissives permet la multiplication de l'E-1 [Bergelson *et al.*, 1993].

3.1.1.3. Récepteur DAF (Decay Accelerating Factor, CD55)

DAF est une protéine transmembranaire largement exprimée à la surface de nombreux types cellulaires. Son rôle est de réguler l'activation du complément lors de la réponse immunitaire [Heeger *et al.*, 2005]. De nombreuses études ont montré que la protéine DAF pouvait recruter un grand nombre de génotypes d'EV : E-3, 6, 7, 11, 12, 13, 20, 21, 24, 29 et 33 ; CV-B1, 3, 5, A21 ; EV-70 [Ward *et al.*, 1994 ; Bergelson *et al.*, 1995 ; Shieh et Bergelson., 2002 ; Shafren *et al.*, 1995 ; 1997 ; Powell *et al.*, 1998 ; Alexander et Dimock, 2002 ; Plevka *et al.*, 2010]. Ces études montrent la fixation des particules virales à la protéine DAF mais l'internalisation serait sous la dépendance d'autres récepteurs tels CAR (CV-B), ICAM-I (CV-A21), et l'intégrine $\alpha V\beta 3$ (E-7 et E-11). Toutes ces données suggèrent que DAF n'est pas le facteur de l'entrée d'un grand nombre d'EVs. Il agirait plus comme un récepteur accessoire ubiquitaire permettant une accumulation des particules virales à la surface des cellules pour faciliter les interactions avec le récepteur authentique, dont ceux décrits ci-dessus CAR et ICAM-1.

3.1.1.3. Récepteur SCARB2

La molécule SCARB2, acronyme de « SCAvenger Receptor class B member 2 », est un facteur à 2 domaines transmembranaires, impliqué dans la réorganisation des compartiments endosomes/lysosomes et dans le transport vers les lysosomes d'une enzyme dégradative : la β -glucocerebrosidase. C'est actuellement le dernier récepteur aux EVs mis en évidence. Il est utilisé par les EV-A : CV-A7, CV-A14, CV-A16, et EV-A71 [Yamayoshi *et al.*, 2012].

3.1.1.4. Récepteur PSGL1 (CD162)

Le ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine est exprimé à la surface des leucocytes et est impliqué lors des premiers stades d'une inflammation. Cette protéine leucocytaire a été identifiée comme un récepteur de l'EV-A71 par la sensibilisation de cellules 293T (épithélium rénal) non susceptibles transfectées avec l'ADN codant PSGL1 [Nishimura *et al.*, 2009]. Les auteurs ont montré que PSGL1 est le récepteur spécifique uniquement de certaines souches d'EV-A71. Une

étude comparative des récepteurs PSGL1 et SCARB2 avec la même souche d'EV-A71 a montré que les particules virales se fixent plus efficacement sur les membranes cellulaires avec PSGL1. Cependant, PSGL1 ne permettrait pas une infection efficace à cause d'une incapacité à induire la décapsidation. Inversement SCARB2 fixe moins bien les particules virales, mais induit leur internalisation et la décapsidation, et semble initier des cycles viraux 100 à 10000 fois plus productifs que PSGL1 [Yamayoshi *et al.*, 2013].

3.1.2. Induction de voies de signalisation cellulaire

L'interaction entre un EV et son récepteur provoque l'activation de voies de signalisation intra cellulaire *via* des tyrosines kinases, qui vont potentialiser l'internalisation. Cependant, les voies de signalisation induites de même que les seconds messagers recrutés dépendent à la fois du récepteur et du type cellulaire. Différents exemples pour mettre en évidence la complexité des mécanismes de signalisation induits par les EVs sont cités ci-dessous (**figure 7**).

La fixation du PV-1 sur son récepteur PVR à la surface de la lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMEC) induit l'activation de tyrosines kinases (qui n'appartiennent pas à la famille Src) et de la RhoA-GTPase. Les tyrosines kinases vont phosphoryler le récepteur PVR qui peut recruter la tyrosine phosphatase SHP-2, et potentialiser l'internalisation du virus. De plus, l'internalisation est facilitée par un réarrangement de l'actine *via* la RhoA-GTPase [Coyne *et al.*, 2007].

La fixation du CV-B3 au co-récepteur DAF à la surface de la même lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMEC) induit l'activation de tyrosines kinases de la famille Src, de la phospholipase C (PLC) et de l'isoforme-3 du récepteur IP₃ (IP₃R type 3). L'activation de la PLC et de l'IP₃R type 3 va permettre une libération intra cellulaire de calcium. Cette brusque élévation de la concentration calcique potentialise l'internalisation du virus et facilite son transport intra cellulaire *via* l'activation de calpaïne-2 [Bozym *et al.*, 2010].

La fixation de la même souche de CV-B3 au co-récepteur DAF à la surface de la lignée de cellules épithéliales intestinales (CaCo-2) induit l'activation des tyrosines kinases Abl et Fyn (mais pas celle de Src). La kinase Abl entraîne un réarrangement du cytosquelette d'actine *via* la protéine Rac1-GTPase, ce qui permet un mouvement vers le récepteur CAR de la particule virale liée à la molécule DAF. La kinase Fyn potentialise l'internalisation de virus par phosphorylation de la cavéoline-1 [Coyne et Bergelson, 2006].

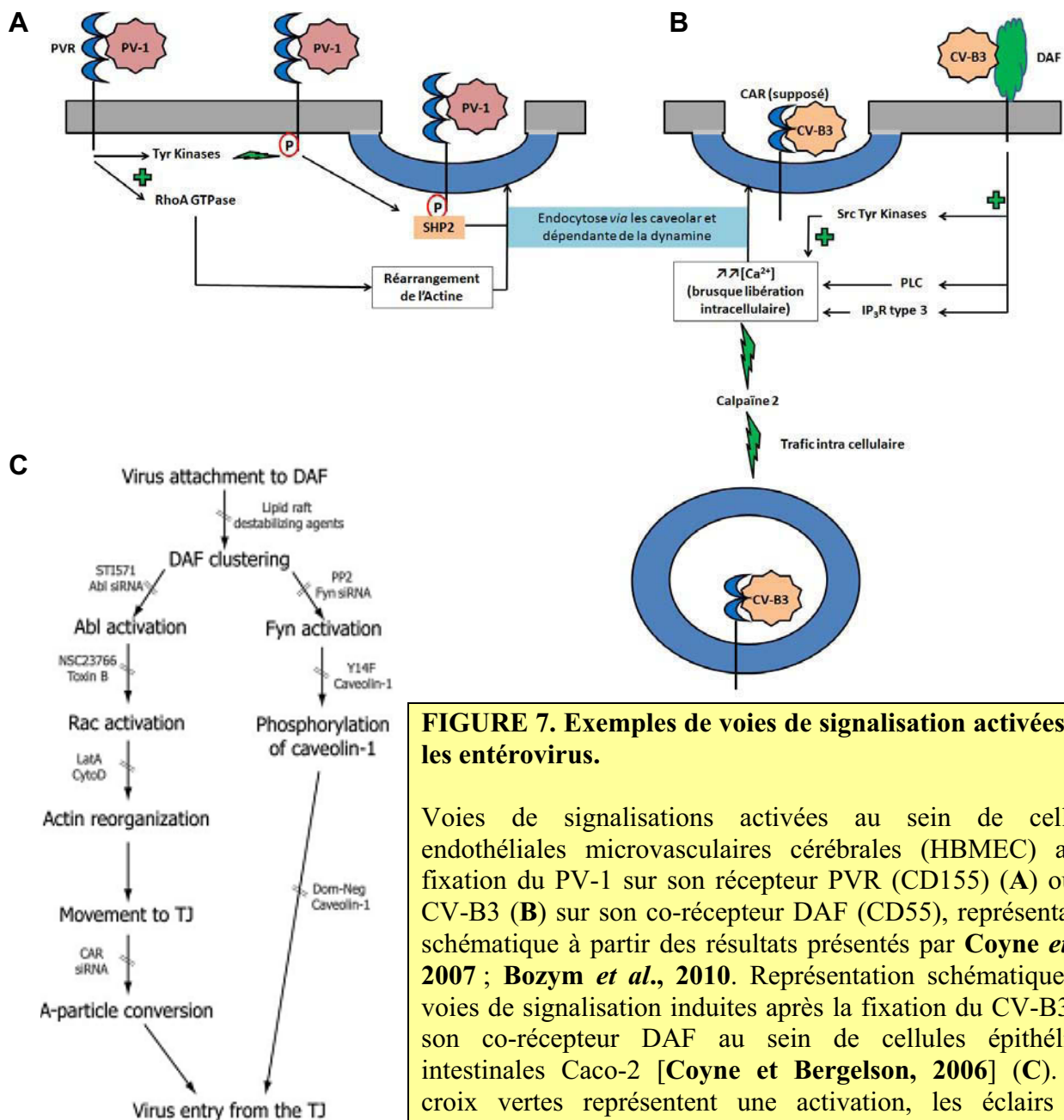


FIGURE 7. Exemples de voies de signalisation activées par les entérovirus.

Voies de signalisations activées au sein de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMEC) après fixation du PV-1 sur son récepteur PVR (CD155) (A) ou du CV-B3 (B) sur son co-récepteur DAF (CD55), représentation schématique à partir des résultats présentés par **Coyne et al., 2007 ; Bozym et al., 2010**. Représentation schématique des voies de signalisation induites après la fixation du CV-B3 sur son co-récepteur DAF au sein de cellules épithéliales intestinales Caco-2 [**Coyne et Bergelson, 2006**] (C). Les croix vertes représentent une activation, les éclairs une stimulation, le P entouré représente un groupement phosphate.

3.1.3. Mécanismes d'entrée dans la cellule et de décapsidation

Les particules virales des EVs sont internalisées dans les cellules par endocytose [eg. **Bozym et al., 2010 ; Coyne et Bergelson, 2006 ; Coyne et al., 2007 ; Ylipastoo et al., 2010**]. Les voies d'endocytose incluent : (1) la macropinocytose, (2) la voie dépendante de la clathrine et de la dynamine, (3) la voie **indépendante** de la clathrine et de la dynamine, (4) la voie dépendante des radeaux lipidiques seuls, (5) la voie dépendante des radeaux lipidiques, de la cavéoline et de la dynamine (caveolar), (6) la voie dépendante des radeaux lipidiques et de la dynamine. L'activation d'une voie par rapport à une autre dépend à la fois du virus, du récepteur et du type cellulaire. L'internalisation du PV-1 et du CV-B3 à l'intérieur de cellules endothéliales microvasculaires

cérébrales est réalisée par un processus d'endocytose dépendant des cavéoles [Coyne *et al.*, 2007 ; Bozym *et al.*, 2010]. L'entrée du CV-B3 dans les cellules épithéliales intestinales CaCo-2 mobilise une endocytose dépendante des clathrines [Bozym *et al.*, 2010 ; Coyne et Bergelson, 2006]. L'entrée des E-11, 25 et 30 dans les cellules GMK emploie un processus dépendant des radeaux lipidiques, ce qui n'est pas le cas des CV-A9, E-7 et E-32 [Ylipastoo *et al.*, 2010].

La libération du génome viral dans le cytoplasme nécessiterait une ouverture de la capside, qui serait produite lors de l'interaction avec le récepteur cellulaire. Un modèle de la libération du génome de PV-1 *via* la formation d'un pore membranaire a été proposé [Hogle, 2002] (figure 8). Dans ce modèle, l'interaction entre la capside et le récepteur PVR cause l'insertion de VP4 et de l'extrémité N-terminale de VP1 dans la membrane plasmique. Ceci permet la formation d'un pore qui va se dilater suite à un brusque afflux de calcium et libérer le génome viral dans le cytosol.

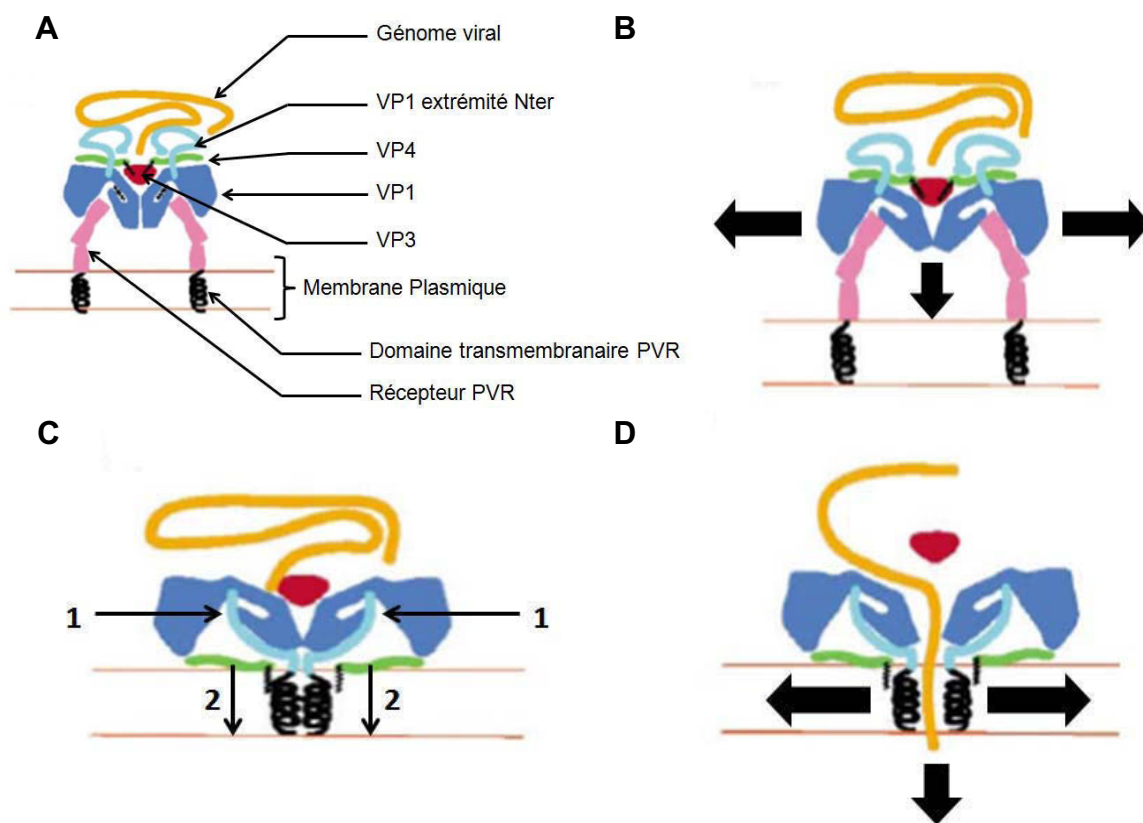


FIGURE 8. Mécanisme théorique d'injection du génome des poliovirus dans le cytoplasme par formation de pores membranaires.

Attachement du virus à son récepteur transmembranaire PVR (A). A 37°C l'interaction entre la particule virale et son récepteur induit une modification de la capside (B). Cette modification de la capside permet l'insertion de l'hélice amphiphatique Nter de VP1 [1] et du groupe myristate de VP4 [2] dans la membrane plasmique (C). Ces insertions permettent la formation d'un canal qui va par la suite s'ouvrir (peut être grâce à un flux concentré de Ca_{2+}), dégager le bouchon formé par la protéine VP3, et permettre une libération du génome viral dans le cytosol (D). Flèches et indications rajoutées selon la légende de la figure d'après Hogle, 2002

3.2. Phase répllicative

3.2.1. Traduction du génome viral

Après sa libération dans le cytoplasme, le génome viral est traduit, la polymérase virale n'est pas encore présente car la capside virale ne véhicule aucune des protéines virales non structurales, à l'exception de la protéine VPg liée à l'extrémité 5' du génome. Le génome des EVs diffère sur un point essentiel par rapport à la majorité des ARNm cellulaires, une absence de coiffe en 5' pour initier la traduction. Une traduction génomique alternative sera initiée par le recrutement interne des ribosomes au niveau de la séquence IRES située dans la région 5'NC (voir § 2.2.1.) [Pelletier et Sonenberg, 1989].

Les protéines virales sont synthétisées d'un seul tenant lors de la traduction à partir de l'ORF unique, puis générées individuellement par clivage de la polyprotéine néo synthétisée. Le clivage de la polyprotéine débute de manière cotraductionnelle dès que les sites actifs protéasiques sont formés. Le premier clivage est réalisé en *-cis* par la protéase 2Apro, qui libère un peptide précurseur P1. Un autre clivage est réalisé par la protéase 3Cpro, qui sépare les peptides précurseurs P2 et P3. Les 3 peptides sont secondairement clivés par ces mêmes protéases pour donner les différentes protéines virales (**figure 9**).

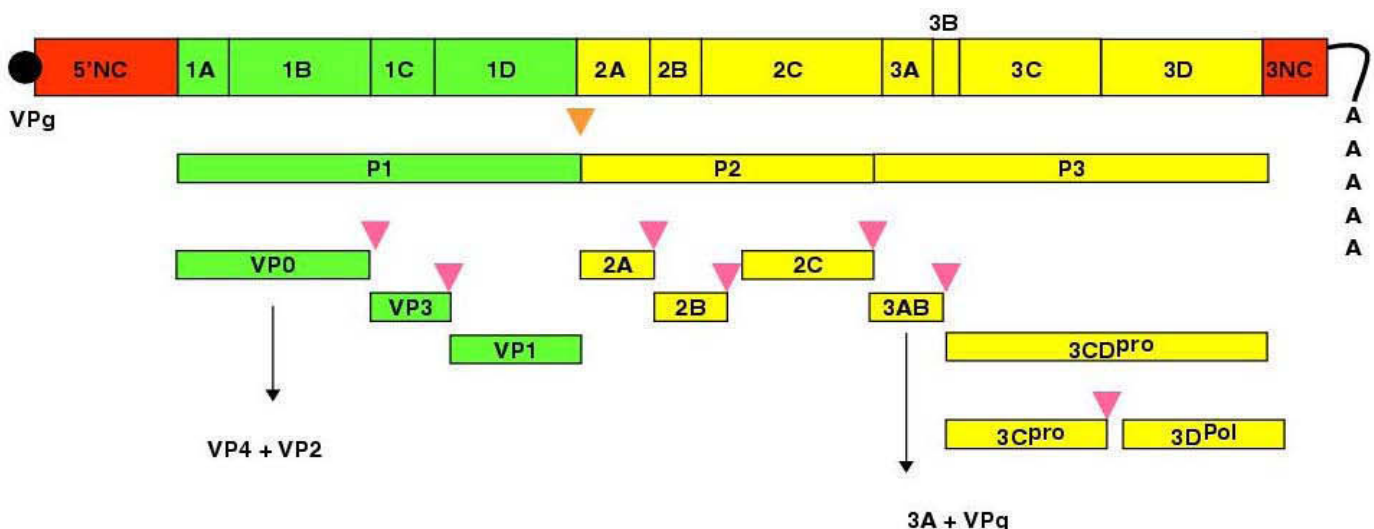


FIGURE 9. Traduction et maturation des protéines virales.

Le génome EV est traduit par un mécanisme d'initiation interne conféré par la séquence IRES localisée dans la séquence 5'NC. Au cours de la traduction, la polyprotéine va subir un premier clivage par la protéase 2Apro, qui va libérer le segment P1 (triangle orange). La protéase 3Cpro va libérer le segment P2 du segment P3, puis va cliver les 3 segments protéiques pour donner les différentes protéines virales (triangle rouge). (Source : **laboratoire de virologie Clermont-Ferrand**).

D'abord marginale, la traduction du génome viral va devenir prédominante, voire exclusive au sein de la cellule infectée. Cette montée en puissance provoque l'accumulation rapide des protéines virales néo synthétisées, lesquelles permettront à la région 5'NC du génome viral de recruter divers effecteurs cellulaires. Il s'agit par exemple de la partie C-terminale du facteur eIF4G (recrutement des ribosomes) [Ohlmann *et al.*, 1996] et de la protéine PCBP – poly (rC) binding protein – qui stabilise les polysomes et protège le génome d'une action exonucléasique 5' ciblant les ARN dépourvus de coiffe [Kempf et Barton., 2008a, b].

3.2.2. Réplication du génome viral

De nombreux travaux sur le poliovirus ont permis de concevoir un modèle des mécanismes moléculaires de la réplication génomique des EVs [Vogt et Andino, 2010]. Le génome des EVs n'est pas seulement un ARNm, c'est aussi la matrice qui permet la synthèse d'un antigénome de polarité négative, lequel servira de matrice pour la réplication du génome viral. Ces deux processus ne peuvent être concomitants. Une commutation de la traduction à la réplication du génome interviendrait lorsque les protéines virales ont été produites en quantité suffisante [Gamarnik et Andino., 1998].

La fixation de l'intermédiaire viral 3CDpro à la structure secondaire en feuille de trèfle « cloverleaf » (extrémité 5') va inhiber la traduction et stimuler la synthèse de l'antigénome [Gamarnik et Andino., 1998]. L'association de 3CDpro avec les effecteurs cellulaires PCBP et PABP forme un complexe ternaire qui circularise le génome viral, générant un complexe de pré-initiation par le rapprochement des séquences Ori L et Ori R (voir § 2.2.3.) [Pilipenko *et al.*, 1992 ; 1996 ; Herold et Andino, 2001 ; Zoll *et al.*, 2009]. La protéine VPg est ensuite poly uridylée (VPg-pUpU) par la polymérase virale 3Dpol en utilisant la séquence CRE comme matrice. Puis VPg-pUpU s'hybride sur la queue poly A (3') pour servir d'amorce à la synthèse du brin complémentaire. Ensuite, l'ARN bicatenaire formé est dissocié sous l'action de la protéine virale 2C. A partir de l'antigénome (polarité négative), l'amorce VPg-pUpU est recrutée au niveau de l'extrémité 3' qui se termine par deux adénines. Cette hybridation sert d'amorce pour initier la réplication des génomes viraux (polarité positive) *via* la polymérase 3Dpol (**figure 10**) [Vogt et Andino, 2010].

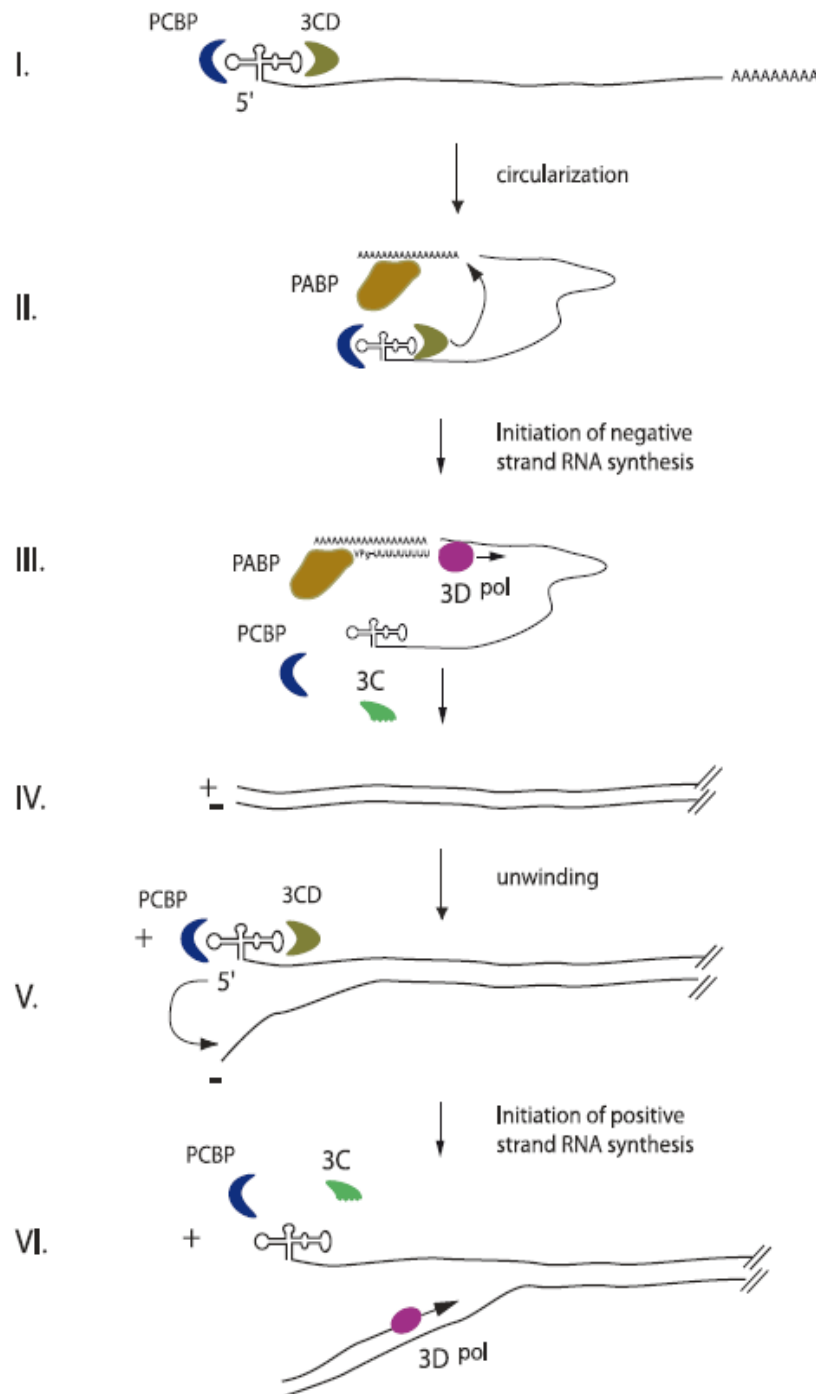


FIGURE 10. Modèle du mécanisme de répllication génomique des entérovirus.

Fixation de l'intermédiaire viral 3CDpro et de l'effecteur cellulaire PCBP au niveau de la structure secondaire (5'NC) en feuille de trèfle « Cloverleaf » (I). Formation d'un complexe ternaire *via* la fixation de l'effecteur PABP sur la queue poly A (3'NC), qui permet la circularisation du génome viral et la formation d'un complexe de pré-initiation (II). La protéine VPg après poly uridylation (VPg-pUpU) va s'hybrider sur la queue poly A et servir d'amorce pour la synthèse de l'antigénome (-) par la polymérase 3Dpol (III). L'ARN bicatenaire est dissocié (IV - V), puis VPg-pUpU va servir d'amorce sur l'extrémité 3' de l'antigénome (-) pour la synthèse de génomes (+) par 3Dpol (VI) [Vogt et Andino, 2010].

3.3. Libération extra cellulaire

3.3.1. Maturation des provirions

La capside des EVs est constituée de 60 protomères, composés chacun d'un exemplaire des protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4. Après la libération du précurseur P1 *via* la protéase 2A, des motifs reconnus par la protéase 3CDpro aux jonctions interprotéiques permettent la séparation des protéines VP0, VP3 et VP1. Ces 3 protéines de capside s'associent pour former un protomère (5S) et 5 protomères forment un pentamère de 14S [Palmenberg, 1982]. Il existe 2 hypothèses concernant l'encapsidation du génome viral. Dans le premier modèle, 12 pentamères vont s'associer pour former une capside vide ou procapside (80S) dans laquelle s'insérera le génome viral *via* une ouverture pour donner un provirion (150S) [Jacobson et Baltimore, 1968]. Dans le second modèle, la réplication et l'encapsidation du génome viral sont concomitantes. Les 12 pentamères vont s'associer autour du génome viral natif pour former le provirion (150S) et les procapsides (80S) ne constitueraient qu'un élément de stockage de pentamères [Nugent *et al.*, 1999]. L'encapsidation du génome viral est un processus spécifique, qui ne cible que les ARN viraux monocaténaire de polarité positive [Novak et Kirkegaard, 1991]. Les provirions subissent ensuite une maturation de la protéine VP0, clivée en VP2 et VP4, ce qui génère les particules virales infectieuses ou virions (160S) [Basavappa *et al.*, 1994]. Une fois l'assemblage terminé, dans les cellules en culture, les virions s'accumulent dans le cytoplasme sous la forme d'amas pseudo-cristallins.

3.3.2. Libérations des virions infectieux

La libération des virions hors de la cellule infectée reste un mécanisme assez peu connu. Deux modes de libération des particules virales existent : un mode lytique et un mode non lytique. Dans le premier, c'est la lyse des cellules infectées qui permet la libération des virions. Une étude montre que la protéine 2B peut perméabiliser la membrane plasmique de la cellule et faciliter la libération du CV-B3 (voir § 4.1.3.) [VanKuppeveld *et al.*, 1997]. D'autres observations suggèrent une libération des particules virales *via* un mode non lytique. Un détournement des mécanismes de l'autophagie par les EVs permettrait l'inclusion des virions dans des vésicules d'origine autophagique, qui seraient expulsées hors de la cellule (voir § 4.3.2.2.) [Dunnebacke *et al.*, 1969 ; Jackson *et al.*, 2005].

4. Effets de l'infection à entérovirus sur la cellule hôte

La multiplication des EVs au sein d'une cellule hôte est le résultat de l'implication des protéines virales dans de multiples processus cellulaires en plus de la réplication/traduction du génome viral : expression génique de la cellule hôte, réponse immunitaire innée de la cellule, viabilité cellulaire, et réorganisation de structures ou d'organites cytoplasmiques. Les modifications induites permettent d'installer l'environnement intra cellulaire nécessaire à la production de virions, mais sont potentiellement cytotoxiques.

4.1. Modulation de l'expression génique de la cellule infectée

Dans une cellule eucaryote, l'expression d'un gène peut être contrôlée à plusieurs niveaux : (i) la transcription, (ii) la traduction, (iii) la maturation et l'exportation extra ou intra cellulaire du produit protéique *via* le trafic entre le réticulum et le Golgi. Parmi les gènes exprimés dans la cellule, ceux qui sont impliqués dans la réponse immunitaire innée (interféron ou cytokines) peuvent être délétères pour le cycle viral. A l'inverse d'autres ne constituent pas une menace pour le cycle viral, mais entreront en compétition pour l'accès à la machinerie cellulaire et aux matières premières (acides aminés et nucléotides). Des études réalisées avec le poliovirus et les coxsackievirus B et décrites ci-dessous montrent que l'expression génique peut être modulée par l'action des protéines 3Cpro, 2Apro, 2B et 2BC.

4.1.1. Modulation de la transcription cellulaire

La transcription d'un gène n'est réalisée que s'il est activé par des facteurs intra nucléaires protéiques initiateurs de transcription. Ces facteurs vont induire un relâchement de la chromatine au niveau du gène à transcrire et recruter une ARN polymérase au niveau d'une séquence promoteur. Trois types d'ARN peuvent être transcrits : (1) les ARN messagers (ARNm), *via* une ARN polymérase II, (2) les ARN ribosomiaux (ARNr), *via* une ARN polymérase I, (3) les ARN de transfert (ARNt), *via* une ARN polymérase III.

La modulation de la transcription cellulaire par les EVs est liée à l'action de la protéase 3Cpro qui peut migrer dans le noyau grâce à la présence d'un site de localisation nucléaire (NLS) dans son précurseur 3CD. Des travaux avec les cellules Hela infectées par le poliovirus ont montré que la protéase 3Cpro pouvait inhiber la transcription des ARN polymérases I, II et III. Pour la transcription des ARNm, la protéine 3Cpro peut cliver la protéine TBP (TATA-binding protein) du complexe protéique d'initiation de transcription TFIID [Clark *et al.*, 1993], l'activateur Oct 1

[Yalamanchili *et al.*, 1997], la protéine p53 qui bloque la mitose cellulaire en phase S et induit l'expression de gène d'apoptose [Weindman *et al.*, 2001]. La protéine 3Cpro peut convertir le facteur de transcription TFIIC en une forme inactive et affecter la transcription des ARNt [Clark *et al.*, 1991]. Enfin, la transcription des ARNr est affectée par la modification des facteurs de transcription SL-1 et UBF [Banarjee *et al.*, 2005].

4.1.2. Modulation de la traduction cellulaire

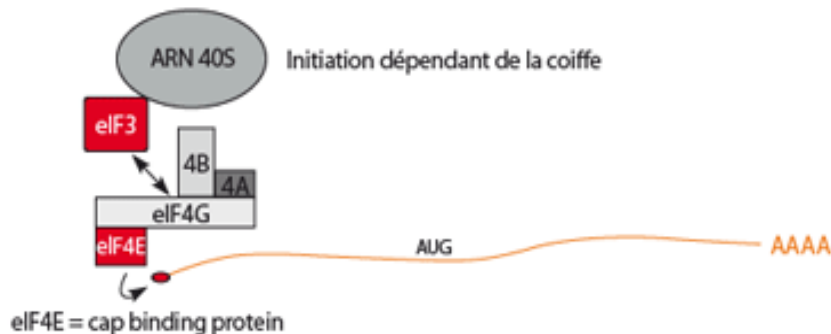
La modulation de la traduction lors de l'infection par les EVs résulte de l'action de la protéase 2Apro. Cette protéine virale cible spécifiquement l'initiation de la traduction dépendant d'une coiffe en 5' car elle clive chacun des facteurs d'initiation eIF4GI et II en deux sous-produits [Gradi *et al.*, 1998]. Les sous-produits amino terminaux restent liés à la coiffe 5' des ARNm mais ne permettent pas le recrutement des ribosomes. A l'inverse, les sous-produits carboxy terminaux conservent la propriété de se lier aux ribosomes et seront recrutés par la séquence IRES des ARN viraux (figure 11) [Ohlmann *et al.*, 1996 ; Kempf et Barton, 2008a ; 2008b]. Cependant, le « shut off » induit par les EVs ne semble pas total. Une étude réalisée avec des cellules Hela infectées par le PV-1 montre que la traduction de certains des ARNm qui possèdent une séquence IRES est maintenue, voire stimulée jusqu'à 3 heures après l'infection. La liste non exhaustive inclut des ARN codant des protéines structurales ou associées au cytosquelette (sous unité alpha 3 de l'intégrine, CD54, pores nucléaires...), des phosphatases kinases associées à la réponse inflammatoire, des récepteurs membranaires (glucocorticoïdes, vitamine D...), des précurseurs de l'interleukine 6 et des sous unités de ribosomes [Johannes *et al.*, 1999]. Une autre étude, menée avec le CV-B3, montre que l'inhibition viro-induite de la traduction dépendante de la coiffe n'affecte que les ribosomes cytoplasmiques. La traduction assurée par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique serait maintenue car elle est effectuée indépendamment de la présence d'une séquence signal ou IRES sur l'ARNm. De plus, les ribosomes restent associés au réticulum au moins jusqu'à 6 heures après l'infection [Lerner et Nicchitta, 2006].

4.1.3. Modulation de la maturation et de l'excrétion des protéines

Le système de maturation et de sécrétion protéique est perturbé par les protéines 3A, 2B et son précurseur 2BC. Ces protéines virales disposent de domaines hydrophobes (extrémité C terminale), qui leur permettent de s'ancrer dans les membranes lipidiques des organites et de bloquer le transport des protéines entre le réticulum et l'appareil de Golgi [Doedens *et al.*, 1995 ; 1996 ; Cornell *et al.*, 2006]. De plus, la protéine 2B « viroporine » peut former des pores membranaires par homo multimérisation, ce qui entraîne une perméabilisation des organites

[DeJong *et al.*, 2008 ; Doedens *et al.*, 1995 ; van Kuppeveld *et al.*, 1997]. Cette perméabilisation perturbe l'homéostasie ionique, avec un efflux du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cet efflux calcique bloque également le trafic protéique [DeJong *et al.*, 2008].

A



B

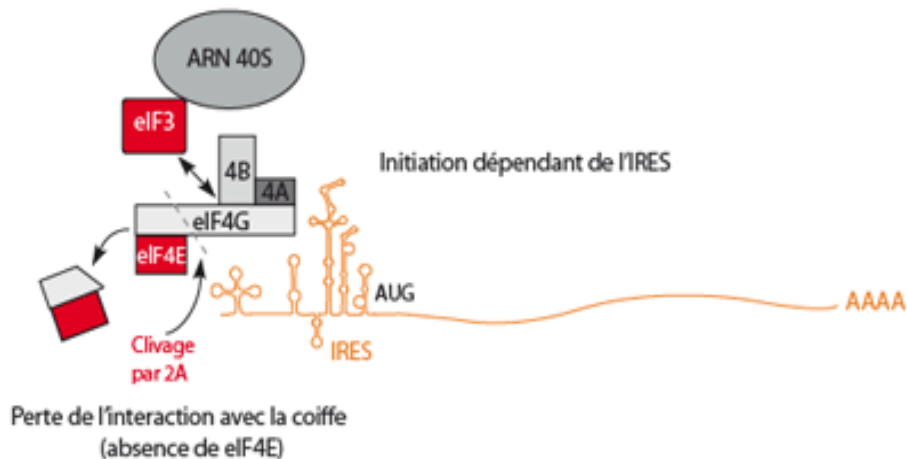


FIGURE 11. Inhibition de la traduction coiffe dépendante par la protéase 2A du poliovirus.

L'initiation de la traduction des ARNm avec une coiffe en 5' est dépendante du recrutement de différents facteurs initiateurs qui vont permettre l'attachement de la sous unité 40S des ribosomes. La protéine eIF4G en est la pierre angulaire. Sur son extrémité N-ter, elle peut recruter le facteur eIF4E qui reconnaît la coiffe ARN. Sur son extrémité C-ter, elle peut recruter divers effecteurs fixant le ribosome (A). Après le clivage de l'extrémité N-ter par la protéase virale 2A, le facteur eIF4G ne peut plus reconnaître les ARNm portant une coiffe en 5'. Comme la partie C-ter n'est pas altérée par 2A, le facteur eIF4G conservera sa capacité à se fixer sur une séquence IRES et de recruter des ribosomes (B).

(Source : www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna)

4.2. Modulation de la réponse immunitaire innée

4.2.1. Mécanismes

La réponse immunitaire innée est activée par des senseurs moléculaires, les PRRs (pattern recognition receptors), qui reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés chez les agents pathogènes (PAMPs : pathogen associated molecular patterns). Ces senseurs moléculaires modifient l'expression de nombreux gènes *via* l'activation des facteurs de transcription IRF (interferon regulating factor) et NF- κ B, qui vont respectivement stimuler une réponse interféron et la production de cytokines pro inflammatoires. Il existe 3 grandes familles de récepteurs PRRs : Toll-Like receptors (TLR), RIG-I-like receptors (RLR) et NOD-like receptors (NLR) [**pour revue Harris et Coyne, 2013**].

Les récepteurs TLR sont transmembranaires et se scindent en 2 catégories selon leurs localisations cellulaires. Les TLR-1, 2, 4, 5 et 6, localisés à la surface de la membrane plasmique, reconnaissent des protéines bactériennes. Les TLR-3, 7, 8 et 9, localisés dans la lumière des endosomes, reconnaissent des motifs d'acides nucléiques, généralement d'origine virale. Le TLR-3 reconnaît des ARN bicaténaires, les TLR-7 et 8, des ARN monocaténaires et le TLR-9, des ADN non méthylés. Ces 4 récepteurs TLR activent les facteurs de transcription IRF et NF- κ B par l'intermédiaire des adaptateurs TRIF et MyD88.

Il existe 3 récepteurs RLR : RIG-I, MDA5 et LGP2, les mieux caractérisés sont RIG-I et MDA5. Le récepteur RIG-I détecte la présence cytoplasmique de petits ARN bicaténaires et d'ARN monocaténaires à extrémité 5' triphosphate. Le récepteur MDA5 détecte la présence cytoplasmique de longs ARN double brin. RIG-I et MDA5 activent les facteurs de transcription IRF et NF- κ B par l'intermédiaire de la protéine mitochondriale MAVS. L'activation de la protéine MAVS peut également entraîner une dépolymérisation de la membrane mitochondriale et initier une entrée en apoptose de la cellule.

L'homme compte 22 types de NLR. Ce sont des récepteurs cytoplasmiques, plutôt dédiés à la reconnaissance des PAMPs bactériens.

4.2.2. Echappement des entérovirus à l'immunité innée

La réplication du génome des EVs génère des ARN double brin qui peuvent être détectés par TLR-3 et MDA5 [**Negishi *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010**]. MDA5 peut détecter les ARN double brin cytoplasmiques. TLR3, présent dans la lumière des endosomes, pourrait les détecter à la faveur des processus de type autophagique généralement induits par les infections à EVs. De plus, la

détection d'ARN double brin par TLR3 nécessite un environnement acide que l'on retrouve dans les autolysosomes [De bonteiller *et al.*, 2005] (voir § 4.3.2.).

La réponse immunitaire innée est limitée pendant la multiplication des EVs selon trois processus d'échappement : (1) l'inhibition de l'expression génique de la cellule (voir § 4.1.) qui bloque en amont la production d'IFN et de cytokines et, en aval, l'expression de récepteurs membranaires immunitaires (MHC, récepteur TNF...) ; (2) la modulation de la mortalité cellulaire et de l'autophagie (voir § 4.3.1. et 4.3.2.2.) ; (3) l'inhibition de la signalisation intra cellulaire par les récepteurs PRR.

La protéase 3C de l'EV-A71 clive l'adaptateur TRIF du récepteur TLR-3 au niveau de sa glutamine 312 et de sa sérine 313 dans des cellules Hela infectées. Ce clivage entraîne une inhibition de l'induction de protéines antivirales [Lei *et al.*, 2011]. La protéase 2A de l'EV-A71 clive l'adaptateur MAVS du récepteur MDA5 au niveau des glycines 209, 251, et 265 [Wang *et al.*, 2013]. Ces 2 adaptateurs sont également clivés par la protéase 3C du CV-B3. L'adaptateur MAVS est clivé au niveau de la glutamine 148 et l'adaptateur TRIF est clivé au niveau de ses domaines N et C terminaux, qui activent respectivement les facteurs IRF3 et NF-κB [Mukherjee *et al.*, 2011].

4.3. Modulation de la mortalité cellulaire

Trois types majeurs de mort cellulaire programmée ont été mis en évidence dans les cellules de mammifères : l'apoptose (type I), la nécrose (type II) et l'autophagie (type III). Ces processus sont largement interconnectés, ils constituent à la fois une réponse à un stress intra ou extra cellulaire et une partie de la réponse immunitaire à des agents infectieux [Agol *et al.*, 2000 ; Hedrick *et al.*, 2010 ; Lamkanfi et Dixit, 2010; Xi *et al.*, 2013]. Les EVs sont tributaires de la cellule hôte pour leur réplication et leur cycle infectieux constitue un stress à l'origine de l'induction d'un processus de mort cellulaire.

4.3.1. Mort cellulaire lors de l'infection à EV : apoptose ou nécrose ?

4.3.1.1. Mécanismes de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, ordonnée et contrôlée, qui du point de vue de la morphologie cellulaire se caractérise par (1) le bourgeonnement de la membrane plasmique, (2) une rétraction cellulaire, (3) la condensation et la fragmentation ordonnée de la chromatine. Comme il n'y a pas de perte d'intégrité de la membrane plasmique, l'apoptose n'induit pas de réaction inflammatoire et n'affecte pas les cellules voisines. L'apoptose nécessite plusieurs pré requis moléculaires : le processus utilise de l'énergie, dépend de cystéines protéases (caspases)

et il est régulé par différents facteurs pro ou anti apoptotiques. L'apoptose peut être enclenchée par 2 voies de signalisation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (**figure 12**) [pour revue Hedrick *et al.*, 2010 ; Lamkanfi et Dixit, 2010].

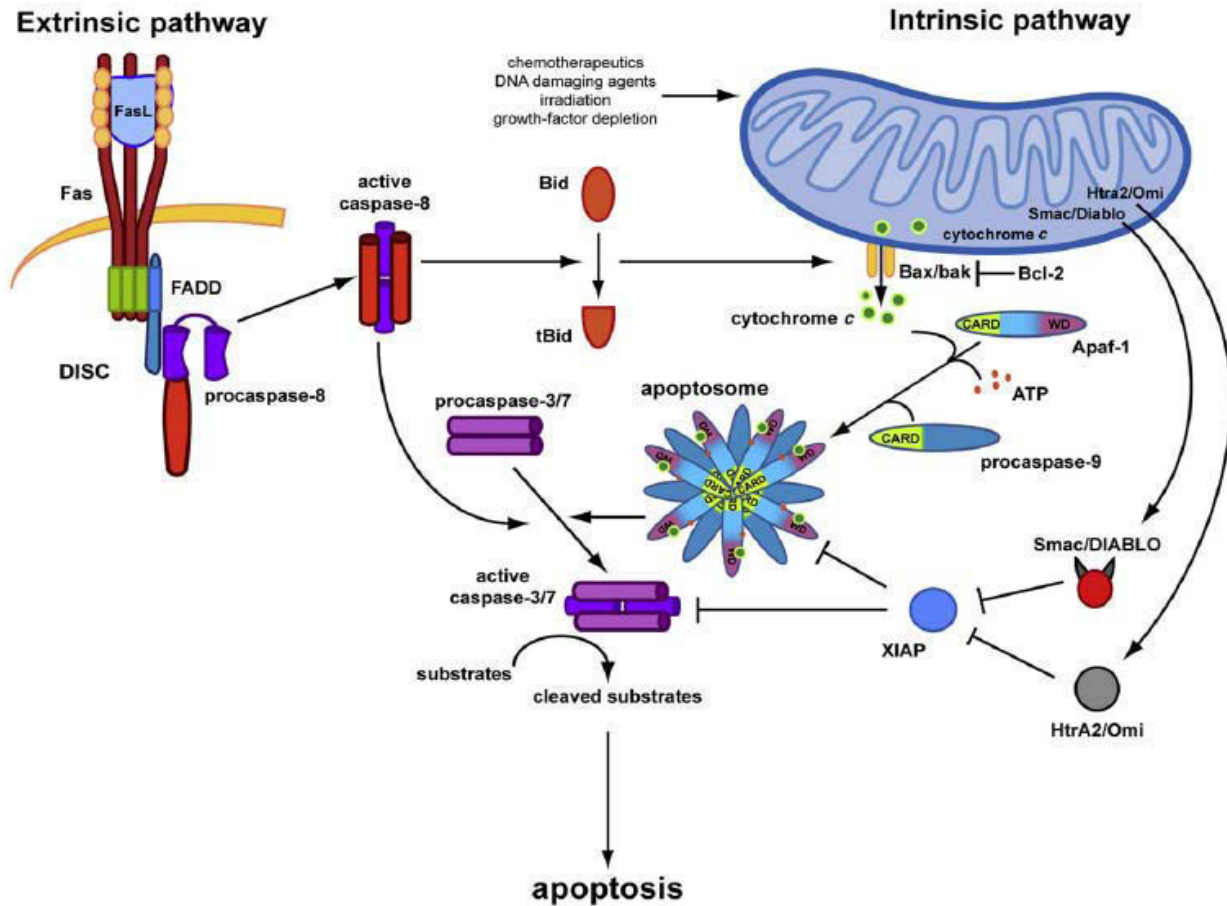


FIGURE 12. Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

La fixation d'un ligand pro apoptotique sur un récepteur de mort cellulaire permet la formation d'un complexe DISC (Death Inducing Signal Complex) entraînant une voie de signalisation extrinsèque permettant l'activation de la caspase 8 et de l'intermédiaire Bid. La caspase 8 va permettre l'activation des caspases 3/7 effectrices de l'apoptose et l'intermédiaire Bid va induire la voie de signalisation intrinsèque.

Des stress intracellulaires peuvent permettre une activation intrinsèque de l'apoptose *via* l'activation des facteurs pro apoptotiques BAK/BAX. Ces facteurs vont former des canaux au sein des mitochondries pour en libérer le contenu apoptogène. Les effecteurs proapoptotiques mitochondriaux (Cytochrome C, Smac/Diablo et HtrA2/Omi) vont entraîner la formation du complexe, l'apoptosome, qui va activer la caspase 9. La caspase 9 activée entraîne l'activation des caspases 3/7 effectrices de l'apoptose. (D'après Lamkanfi et Dixit, 2010).

La voie intrinsèque (ou mitochondriale) répond à un stress intra cellulaire. BAX et BAK, deux facteurs cytoplasmiques pro-apoptotiques, forment des pores dans les membranes des mitochondries, provoquant la sortie irréversible du contenu mitochondrial dont le cytochrome C et les protéines Smac et Diablo. Le cytochrome C va se lier à l'effecteur cytoplasmique APAF-1 et ce complexe active la caspase 9 (apoptosome). S'en suit une cascade protéolytique par les caspases 3, 6 et 7 effectrices de l'apoptose. Cette voie est inhibée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-XL. De la même manière, l'activation des caspases 3, 6 et 7 est inhibée par le facteur anti-apoptotique IAPs, qui peut être inhibé par les facteurs pro-apoptotiques Smac/Diablo.

La voie extrinsèque est induite par l'activation de récepteurs transmembranaires de mort (DR) qui détectent des stress extra cellulaires. On compte chez l'homme 6 récepteurs DR : le récepteur Fas, le récepteur du TNF- α , les récepteurs DR3 et DR6, et les récepteurs « TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 » : TRAIL-1, DR4 et DR5. L'interaction d'un ligand avec les récepteurs Fas, DR4 et DR5 provoque le recrutement cytoplasmique d'un module FADD, lequel active la caspase 8. Cet ensemble forme un « death inducing signaling complex » ou DISC, dont l'action peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique cFLIP. Alternativement, le récepteur du TNF- α et DR3 vont recruter les complexes TRADD et RIPK1. L'activation de la caspase 8 cause l'activation protéolytique des caspases effectrices entraînant l'apoptose. La caspase 8 peut amplifier le signal apoptotique en clivant la protéine pro-apoptotique Bid, dont la forme tronquée (tBid) stimule l'action de BAX et BAK.

4.3.1.2. Mécanismes nécrotiques

Lorsque les conditions ne sont pas réunies pour le déroulement de l'apoptose (inhibition, faible niveau énergétique...), la cellule peut subir une mort par nécrose. La nécrose diffère de l'apoptose par beaucoup d'aspects : (1) gonflement des cellules, (2) distension de divers organites dont les mitochondries, (3) agglutination / dégradation aléatoire de la chromatine, (4) endocytose ou autophagie excessive, (5) pas d'intervention des caspases (aucune protéine spécifique n'est synthétisée), (6) pas d'énergie nécessaire et (7) perte d'intégrité de la membrane plasmique. La nécrose est souvent associée au déclenchement d'une réaction inflammatoire causée par la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extra cellulaire. La nécrose a longtemps été considérée comme une mort purement accidentelle et non contrôlée. En fait, ce processus qui semble programmé et contrôlé a été rebaptisé nécroptose. Divers acteurs cellulaires et voies de signalisation en assurent le déclenchement. Les modules protéiques RIP1 et RIP3 associés aux récepteurs TNF interagissent avec diverses enzymes ou avec les mitochondries. Les mitochondries peuvent produire des espèces réactives oxygénées (ROS) et activer la protéine PARP-1, ce qui

provoque une pénurie d'ATP. Cette pénurie se traduit par l'arrêt des pompes membranaires qui maintiennent l'équilibre ionique de la cellule. Un afflux important et brutal de calcium dans le cytoplasme entraîne une suractivation des calpaïnes, lesquelles provoquent la rupture des lysosomes (figure 13) [Hedrick *et al.*, 2010 ; Lamkanfi et Dixit, 2010 ; McCall, 2010].

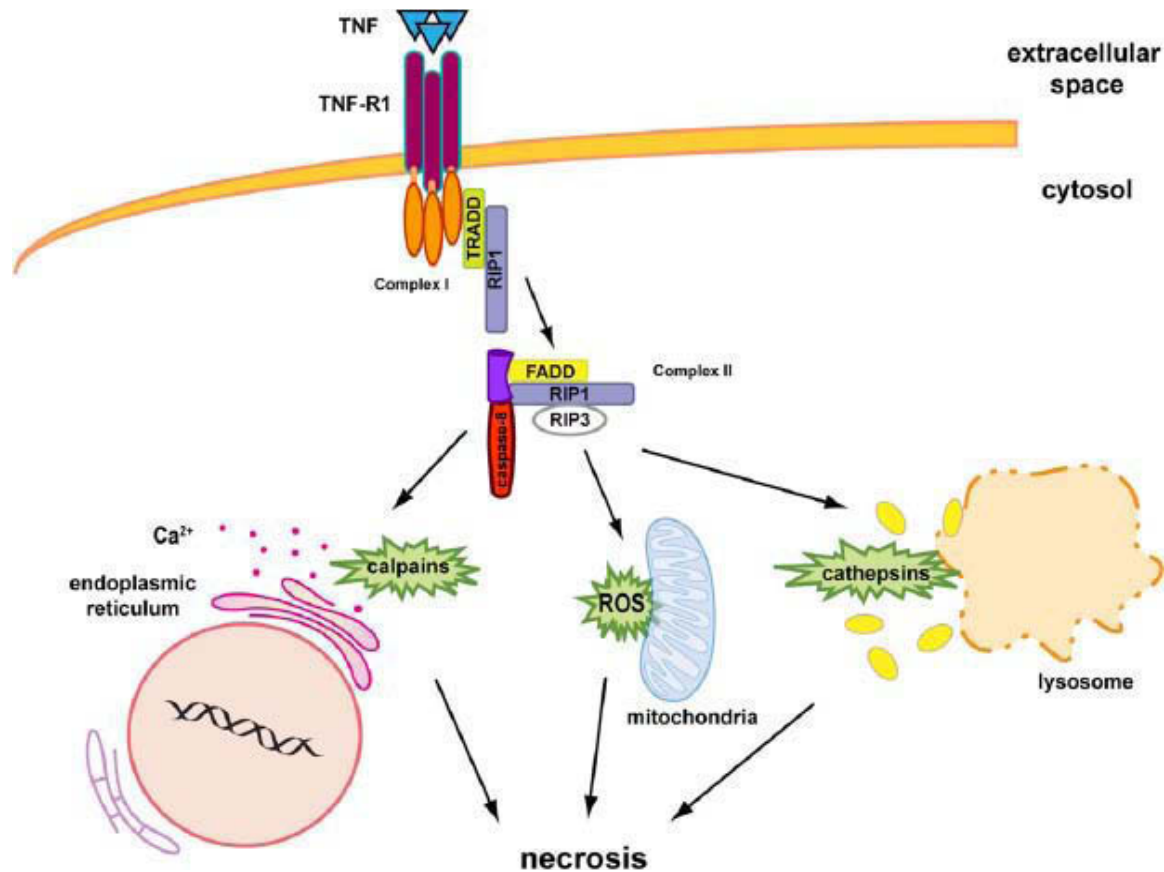


FIGURE 13. Exemple de nécrose induite.

La fixation de TNF sur son récepteur peut entraîner le recrutement des modules RIP1 et RIP3, qui peuvent induire des mécanismes nécrotiques. Exemples : Activation de Calpaïnes *via* la libération du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique ; production par les mitochondries d'espèces réactives oxygénées (ROS) ; ou encore rupture des lysosomes *via* l'activation de cathepsines. (D'après Lamkanfi et Dixit, 2010).

4.3.1.3. Modulation de l'apoptose et de la nécrose par les entérovirus

De nombreux travaux indiquent que les EVs peuvent à la fois initier, inhiber et orienter la mort de la cellule [eg. Agol *et al.*, 2000 ; Belov *et al.*, 2003 ; Bozym *et al.*, 2011 ; Liang *et al.*, 2004 ; Neznanov *et al.*, 2001 ; Romanova *et al.*, 2005 ; Xi *et al.*, 2013]. L'infection des cellules HeLa par le PV-1 induit la mort par apoptose au cours des premières étapes du cycle viral. Son déclenchement semble être une réaction de défense cellulaire causée par l'inhibition de l'expression des gènes cellulaires (voir § 4.1.) ; [Neznanov *et al.*, 2001]. La multiplication virale va stopper le

processus d'apoptose avant son achèvement [Agol *et al.*, 2000]. L'inhibition du cycle viral par des drogues permet au processus apoptotique d'arriver à son terme. Au stade intermédiaire du cycle viral, un basculement semble s'opérer vers une mort par nécrose. Ce basculement serait dû à l'impossibilité d'achever l'apoptose et à la réunion de conditions favorables au déclenchement d'une nécroptose. L'enchaînement séquentiel observé avec les cellules Hela infectées par PV-1 varie avec le type cellulaire [Romanova *et al.*, 2005]. Ces variations sont retrouvées pour d'autres génotypes. Des cellules Hela et Caco-2 infectées par le CV-B3 meurent après 7 à 10 heures d'infection : la mort des cellules Hela est due à l'apoptose, celle des cellules Caco-2 à la nécrose dépendant des calpaïnes [Bozym *et al.*, 2011]. Des cellules endothéliales HUVEC ou microvasculaires de derme (HDMEC) infectées par les CVB ne présentent pas un taux de mortalité significatif [Conaldi *et al.*, 1997 ; Zanone *et al.*, 2003], mais l'EV-A71 induit l'apoptose des cellules HDMEC (endothélium de derme) [Liang *et al.*, 2004]. Ces rapports complexes entre le cycle infectieux des EVs et les processus de mort cellulaire mettent en évidence l'importance des conditions d'étude, en plus du type de virus et du type cellulaire.

4.3.2. Mécanisme et modulation de l'autophagie par les entérovirus

4.3.2.1. Mécanismes de l'autophagie

La macro-autophagie (désignée par le terme autophagie) peut être considérée comme un mécanisme à double tranchant. C'est avant tout un processus de survie cellulaire, qui s'oppose à l'apoptose, mais il peut aussi entraîner la mort de la cellule s'il est suractivé. L'autophagie constitue également un mécanisme immunitaire inné, qui participe au processus de présentation d'antigènes à la surface de la cellule infectée [Jordan et Randall, 2012].

L'autophagie se caractérise par la présence de vacuoles, dans lesquelles sont dégradées les protéines cytoplasmiques et les organites pour en recycler les constituants. L'induction de l'autophagie est stimulée par l'inhibition de la voie mTOR par une carence en nutriments, un manque de facteurs de croissance, une agrégation de protéines cytoplasmiques, un stress fonctionnel du réticulum endoplasmique ou la production de ROS. L'activation de récepteurs PPR (TRIFF, TLR) et la production de cytokines (IFN) peuvent également déclencher l'autophagie. Il s'agit d'un processus particulièrement dynamique, comprenant plusieurs étapes. L'autophagie débute par la formation de phagophores issus de la nucléation de membranes du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. L'élongation et la fusion des extrémités du phagophore *via* l'action de l'effecteur LC3-II produit une vésicule à double membrane qui englobe des composants cytoplasmiques. Cette vésicule ou autophagosome peut fusionner avec des endosomes pour former

un amphisome. La fusion de lysosomes avec un autophagosome (ou un amphisome) génère un autolysosome dont le contenu acide et protéolytique permet la dégradation des composants séquestrés. L'ensemble de ces étapes est appelé le flux autophagique (**figure 14**) [pour revue voir **Jordan et Randall, 2012**].

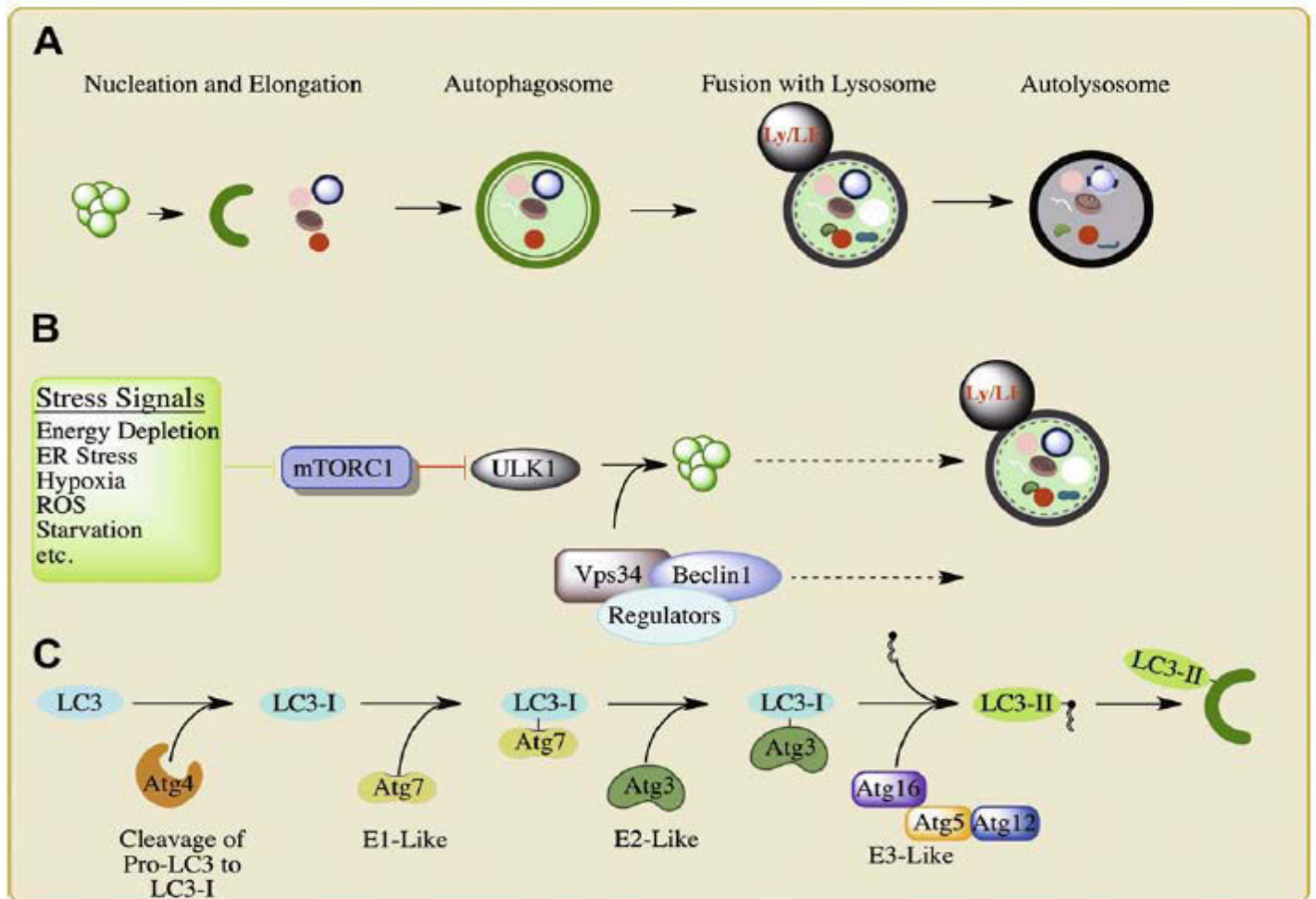


FIGURE 14. Etapes de l'autophagie.

L'autophagie peut se scinder en 4 étapes : **Nucléation et élongation** de membranes qui vont former des phagophores englobant des composés cytoplasmiques ; **fusion des autophagosomes** avec des Lysosomes ; Maturation des autophagosomes en **autolysosomes** (A). L'induction d'un processus autophagique passe par différents signaux et stress, qui vont lever l'inhibition qu'exerce le complexe mTORC1 sur les effecteurs autophagiques (B). Le facteur LC3-I est conjugué à un phosphatidylethanolamine pour générer LC3-II, qui va ensuite s'insérer dans les phagophores et permettre leur maturation en autophagosomes (C). (D'après **Jordan et Randall, 2012**).

4.3.2.2. Modulation de l'autophagie par les entérovirus

L'autophagie est induite en tant que réponse immunitaire cellulaire contre de nombreux pathogènes, mais certains d'entre eux ont évolué en utilisant certaines étapes pour leur propre cycle infectieux. L'autophagie peut être modulée pendant le cycle de différents génotypes d'EVs. Le CV-B3 peut initier un processus autophagique [Wong *et al.*, 2008]. En se fichant dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, les protéines 2BC et 3A du PV-1 peuvent entraîner la formation de phagophore dont la maturation en autophagosome est assurée par la conversion du facteur LC3-I en LC3-II [Jackson *et al.*, 2005 ; Richards et Jackson, 2012]. L'EV-A71 peut induire l'autophagie par inhibition de la voie mTOR [Huang *et al.*, 2009 ; Xi *et al.*, 2013]. Cependant l'évolution et la finalisation du flux autophagique semblent varier selon le virus. Lors de l'infection par le CV-B3, le flux autophagique est prématurément stoppé ou ralenti par inhibition de la fusion lysosome/autophagosome, qui, si elle était menée à son terme, réduirait le rendement viral [Wong *et al.*, 2008]. A l'inverse dans les cellules infectées par le PV-1, non seulement le flux autophagique est conduit jusqu'à son terme, mais semble impliqué dans la maturation et la libération des particules virales infectieuses [Jackson *et al.*, 2005 ; Richards et Jackson, 2012]. Par ailleurs, la formation d'autophagosomes stimule la réplication virale et pourrait constituer un mécanisme non lytique de libération des particules virales [Richards et Jackson, 2012].

4.4. Remodelage cytoplasmique, génération de l'usine virale

Les cellules infectées par un EV développent un ECP, c'est-à-dire un ensemble de changements morphologiques caractéristiques en microscopie photonique. En microscopie électronique, l'ECP des EVs comprend la condensation de la chromatine, une déformation du noyau, une réorganisation ou disparition des organites, un arrondissement de la cellule et une prolifération de structures vésiculaires [Bienz *et al.*, 1973]. Cette manifestation semble être une caractéristique commune à de nombreux virus à ARN liée à la réplication du génome [Miller et Krinjnse-Locker, 2008]. Les mécanismes moléculaires mis en jeu pour induire ces réarrangements sont mal connus pour beaucoup d'EVs, à l'exception du PV-1 et du CV-B3.

4.4.1. Origine et formation des vésicules viro-induites

Les travaux menés avec le PV-1 et le CV-B3 indiquent que les vésicules viro-induites se forment à partir d'une mosaïque de membranes exhibant des marqueurs de l'ensemble du système de sécrétion de protéines : cis- et trans-Golgi, réticulum endoplasmique et lysosomes [Belov *et al.*, 2012 ; Egger et Dienz, 2005 ; Egger *et al.*, 2000 ; Limpens *et al.*, 2011 ; Schlegel *et al.*, 1996].

Cette recombinaison des membranes est le résultat de l'action des protéines virales 3A et 2B/2BC (voir § 4.1.3). En s'accumulant à la surface des membranes lipidiques du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, les protéines virales provoquent leur désassemblage par un processus de type autophagique (voir § 4.3.2.2) ; [Suhi *et al.*, 2000 ; Belov *et al.*, 2007 ; Richards et Jackson, 2012].

Deux élégantes études par microscopie et tomographie électronique en 3D, publiées presque simultanément, ont permis de mieux appréhender la génération et la structure des formations multivésiculaires au sein des cellules Vero infectées par le CV-B3 et des cellules Hela infectées par le PV-1 [Belov *et al.*, 2012 ; Limpens *et al.*, 2011]. Le modèle qui ressort de ces études suggère que des tubules à simple membrane se forment par allongement des organites cités ci-dessus. Puis ces tubules constituent de minces et longues citernes qui s'invaginent comme des autophagosomes. Après la fusion de leurs extrémités, les citernes forment des vésicules à double membrane (70 – 400 nm de diamètre). L'invagination de citernes autour d'autres citernes produit la formation de vésicules à multiples membranes. La succession des phénomènes d'apposition, d'invagination et de fusion de membranes permet de constituer une formation complexe, évoquant la structure d'une éponge (figure 15).

4.4.2. Complexe de réplication membranaire ou « usine virale »

Ces formations multivésiculaires constituent des plateformes qui assurent la réplication génomique voire l'encapsidation [Bienz *et al.*, 1992 ; Egger et Bienz, 2005 ; Egger *et al.*, 2000]. Elles forment ce qui est parfois appelé une « usine virale ».

La protéine 3A ancrée à la surface des membranes, recrute un complexe protéique formé de GBF1 et d'ARF1. Ces deux protéines favorisent l'action de la PI4KIII β qui catalyse la production de lipides PI4P et permet leur incorporation dans les membranes. Cette composition lipidique PI4P au sein des membranes permet la fixation de la polymérase virale 3D et induit une courbure des membranes favorisant la formation des vésicules (figure 15) [Hsu *et al.*, 2010 ; Miller et Krinjse-Locker, 2008].

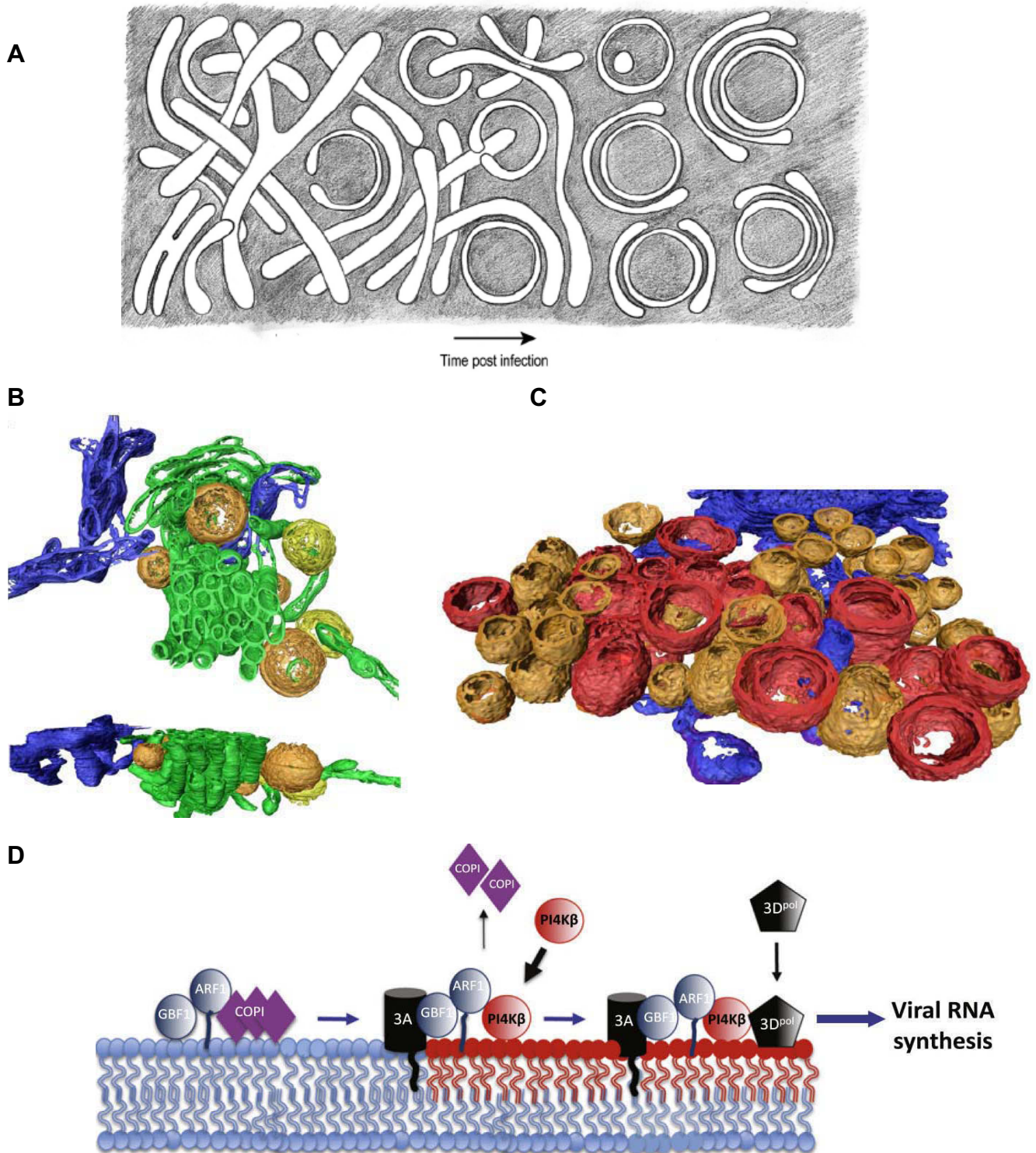


FIGURE 15. Formation des structures de réplication génomique du CV-B3.

Modèle d'évolution des structures de réplication induite par le CV-B3. Au stade précoce, des tubules à simple membrane vont s'invaginer et se refermer pour former au stade tardif des vésicules à multiples membranes (A). Modélisation en 3D de micrographies électroniques, à partir de coupes tomographiques réalisées au stade précoce (B) et tardif de l'infection (C). Représentation schématique de la mise en place des complexes de réplication génomique à la surface des membranes. La protéine virale 3A insérée au sein des membranes va promouvoir le recrutement de la PKI4IIIβ. La PKI4IIIβ va catalyser la production de PI4P (rouge), qui à leur tour vont faciliter le recrutement à la surface des membranes de la polymérase virale 3Dpol (D). (Sources : Images A – C d'après Limpens *et al.*, 2011 ; image D d'après Hsu *et al.*, 2010).

5. Evolution des entérovirus

Les EVs, comme une majorité de virus à ARN, se caractérisent par une grande variabilité génétique, conséquence de 2 mécanismes : les mutations et les recombinaisons (**figure 16**). La variabilité génétique générée lors de la dissémination entre les individus est le moteur évolutif des EVs ; elle se traduit par la grande diversité de ces virus. Ces mécanismes d'évolution permettent aux EVs de s'adapter à diverses pressions de sélection et d'avoir un spectre tissulaire très vaste.

5.1. Les mutations

Les « erreurs » (substitutions nucléotidiques) commises par la polymérase virale 3Dpol, enzyme dépourvue d'activité éditrice, sont une source de mutations ponctuelles. Le taux de substitution *in vitro* de la polymérase 3Dpol des poliovirus a été évalué entre 10^{-4} et 10^{-3} , soit une mutation par génome [**Ward et al., 1988**]. Les mutations ponctuelles sont le principal mécanisme de la diversité génétique des EVs au sein d'un même génotype. Les taux de mutations ponctuelles varient en fonction de la pression de sélection exercée sur un locus. Par exemple, les protéines de capside sont soumises à la pression sélective de l'immunité, qui vise à neutraliser le virus, et aux contraintes structurales, qui visent à maintenir la conformation spatiale de la capside. Ainsi le gène 1D est soumis à une forte contre-sélection des mutations non synonymes (sélection négative). Le polymorphisme des acides aminés y est limité à quelques sites exposés à la surface [**Bailly et al., 2009**].

5.2. Les évènements de recombinaison génétique

Lors de co-infections par deux souches d'EVs, des portions de leurs génomes peuvent être échangées pendant la réplication, créant des recombinaisons génétiques et des variants « recombinants » (ou mosaïques). La recombinaison génomique est provoquée par les sauts de la polymérase 3Dpol d'une matrice à une autre. Les sites de recombinaison sont beaucoup plus fréquents dans la partie codant les protéines non structurales. La comparaison des souches EVs indique que les évènements de recombinaison sont fréquents au cours de la transmission des souches des génotypes épidémiques [**Bailly et al., 2011 ; Mirand et al., 2007**]. Chez les poliovirus vaccinaux, la recombinaison avec d'autres EVs de l'espèce C (CV-A) peut être associée à l'acquisition de propriétés pathogènes neurovirulentes [**Joffret et al., 2012**].

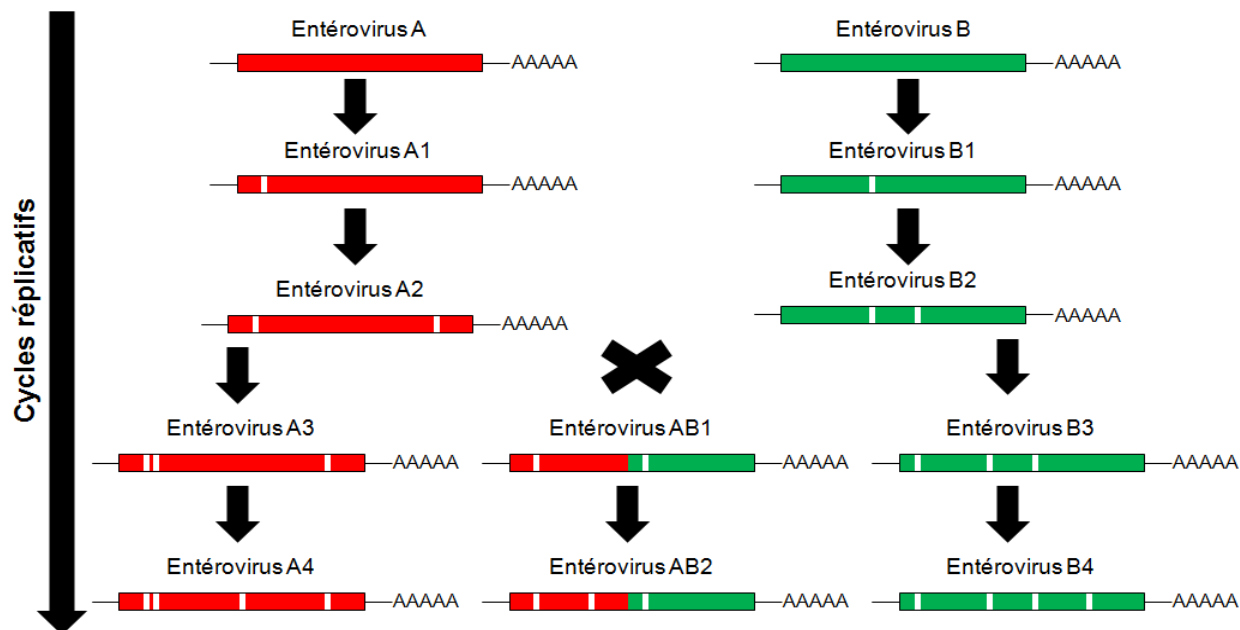


FIGURE 16. Mécanismes génétiques d'évolution des entérovirus.

Les entérovirus peuvent évoluer rapidement *via* l'introduction de mutations (traits blancs) induites par la mauvaise fidélité de la polymérase virale 3D pol dépourvue d'activité éditrice. Lors de co-infection des événements de recombinaison génomique (croix) peuvent se produire et générer des génomes recombinants ou (mosaïques).

6. Epidémiologie, physiopathologie des infections à EV

6.1. Transmission

L'homme est le seul réservoir naturel des EVs humains. L'absence d'enveloppe rend les EVs résistants dans l'environnement, où ils peuvent conserver leur pouvoir infectieux pendant des mois dans des conditions de température et de pH favorables. Ils peuvent être retrouvés dans les coquillages, sur des végétaux contaminés par des aérosols, dans les eaux de surface, les eaux usées, les boues [Fuhrman *et al.*, 2005]. Leur persistance dans l'eau de consommation est inversement associée au niveau socioéconomique. La transmission des EVs se fait principalement par voie fécale-orale et/ou respiratoire, par contacts directs ou indirects avec des personnes, objets ou aérosols contaminés. Les contacts directs ou indirects avec des fluides corporels (larmes, salive, liquide de vésicules) contaminés peuvent contenir le virus des génotypes associés aux conjonctivites hémorragiques et infections cutanéomuqueuses. La transmission des EVs est facilitée dans les communautés urbaines denses et/ou fermées : crèche, écoles, maison. Des cas d'infections nosocomiales à EV ont également été rapportés, principalement au sein d'unités pédiatriques [Bailly *et al.*, 2000a ; Civardi *et al.*, 2013].

6.2. Épidémiologie

L'épidémiologie des EVs peut suivre un profil endémique ou épidémique en fonction du génotype, du climat, de la localisation géographique, de la maladie associée, de l'assainissement des eaux usées, et des modes de prévention liés à l'hygiène générale. La propagation épidémique dans les pays à climat tempéré se caractérise par une circulation inter humaine à bas bruit, ponctuée de pics épidémiques saisonniers de quelques semaines ; les épidémies se produisent en été et en automne (**figure 17**) [**Chambon *et al.*, 2001**]. Dans les régions tropicales, la propagation est de type endémique et les épidémies seraient occasionnelles.

La sévérité, le pronostic et les manifestations cliniques des infections à EVs sont principalement liés au statut immunitaire. Typiquement, les infections à EVs sont associées aux jeunes enfants, et particulièrement aux nouveau-nés [**Abzug, 2013**]. Toutefois, la fréquence des infections symptomatiques chez les adultes est probablement sous estimée [**Peigue-Lafeuille *et al.*, 2002 ; Khetsuriani *et al.*, 2006**].

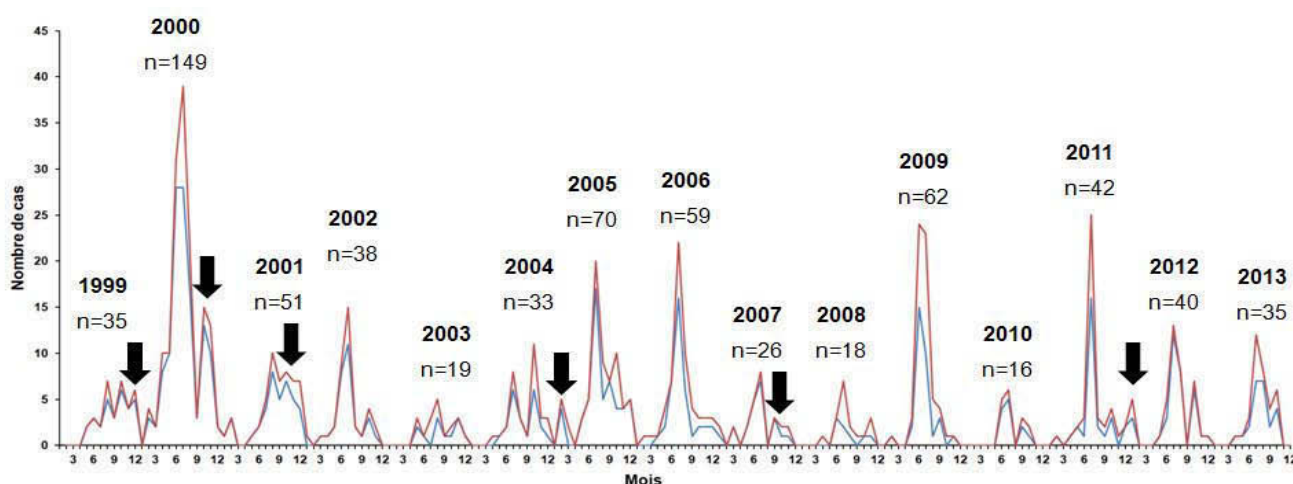


FIGURE 17. Méningites à entérovirus au CHU de Clermont-Ferrand de 1999 à 2013.

Circulation épidémique des entérovirus chez les adultes (bleu) et les enfants (rouge) avec des pics d'ampleurs variables en fonction des années. Les pics sont majoritairement retrouvés lors de la période estivo-automnale. Cependant la circulation des EVs à bas bruit peut également être observée en début d'hiver (flèches noire).

6.3. Physiopathologie générale

La pathogénie des EVs est connue par les études menées chez des singes infectés par le poliovirus [**Bodian, 1955 ; Sabin, 1956**]. Les EVs contaminent l'organisme au niveau de la bouche et des voies respiratoires. Puis, des sites primaires de réplication s'établissent au sein des tissus lymphoïdes des muqueuses intestinales (plaques de Peyer) et de la gorge (amygdales).

A partir de ces sites primaires, les EVs sont disséminés dans le sang à partir des ganglions cervicaux et mésentériques et la virémie permet d'atteindre différents organes ou tissus. L'infection se traduira par des expressions cliniques de gravité variable (**figure 18**). Les atteintes tissulaires consécutives à la virémie nécessitent un franchissement par le virus de l'endothélium vasculaire irriguant ces tissus (**voir § 7.9**). La grande diversité des EVs les rend responsables de plusieurs syndromes cliniques. La majorité des infections sont inapparentes et les infections symptomatiques sont aiguës et spontanément résolutives chez les personnes immunocompétentes

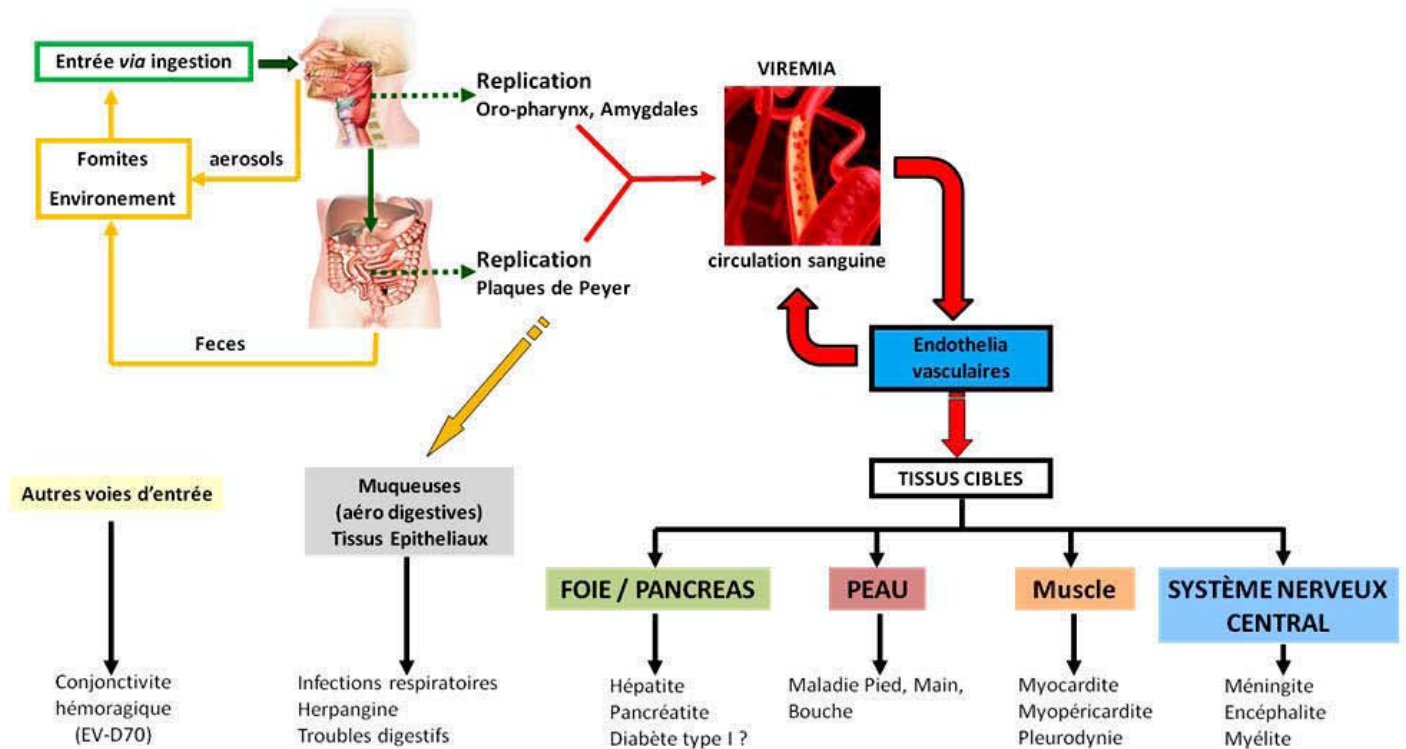


FIGURE 18. Physiopathologie connue des entérovirus.

Après contamination par voie orale, les entérovirus pénètrent au niveau des muqueuses aéro digestives et se multiplient au niveau des tissus lymphoïdes secondaires (Amygdales – Plaques de Peyer). Après multiplication, les entérovirus passent dans la circulation sanguine (virémie) et diffusent vers différents organes.

6.4. Pathologies Humaines

6.4.1. Les atteintes du système digestif

Il est fréquent de retrouver des symptômes gastro-intestinaux (vomissements, diarrhées...) associés aux infections symptomatiques à EVs. Cependant si l'on prend en compte le fait que les EVs établissent un site primaire d'infection au niveau des tissus lymphoïdes intestinaux avant de pénétrer plus profondément dans l'organisme, les manifestations entériques sont paradoxalement rares.

6.4.2. Les infections cutané-muqueuses

6.4.2.1. Les herpangines

Les herpangines sont des infections de la gorge qui se définissent par la présence de vésicules caractéristiques sur le palais et les amygdales. Se sont des angines vésiculeuses aiguës, fébriles et très contagieuses.

6.4.2.2. Le syndrome pied-main-bouche

Le syndrome pied-main-bouche se caractérise par des éruptions de vésicules sur la plante des pieds, la paume des mains et dans la cavité buccale. Cette maladie bénigne semble plus particulièrement associée aux EVs de l'espèce A. Lorsqu'elle est causée par l'EV-A71, elle peut être associée à des manifestations sévères voire mortelles : encéphalite, paralysie flasque, détresse cardio respiratoire (**figure 19**) [Abzug, 2013 ; Chen *et al.*, 2007a].

6.4.2.3. La conjonctivite hémorragique aiguë

La conjonctivite hémorragique aiguë est caractérisée par une période d'incubation courte précédant l'apparition rapide d'une inflammation de la conjonctive et d'hémorragies sous conjonctivales. Contrairement aux autres infections à EVs, la conjonctivite hémorragique aiguë est presque exclusivement associée aux génotypes EV-D70 et CV-A24. La durée de cette maladie auto résolutive et sans séquelle est de 1 à 2 semaines.

6.4.3. Infections respiratoires

Les EVs sont une cause commune d'infections respiratoires chez les enfants. Elles représentent la seconde atteinte la plus fréquemment associée aux EVs, après les méningites aiguës [Jacques *et al.*, 2008]. Les atteintes respiratoires par un EV sont majoritairement hautes (rhume, laryngite et pharyngite) et plus rarement basses (bronchiolite ou pneumonie).

6.4.4. Les atteintes musculaires

6.4.4.1. Atteintes cardiaques

Les EVs, plus particulièrement les CVB, peuvent être associés à des myocardites et myopéricardites aiguës. L'inflammation peut évoluer vers une myocardite chronique aboutissant à une cardiomyopathie dilatée [Abzug, 2013 ; Leveque *et al.*, 2012].

6.4.4.2. La pleurodynie

La pleurodynie ou maladie de Bornholm est une atteinte de muscles intercostaux et/ou abdominaux, qui se caractérise par des douleurs abdominales et un syndrome pseudo grippal.

Maladie inconnue au Cambodge – bulletin

9 juillet 2012 - Dans le cadre de la poursuite des investigations sur la maladie inconnue, le Ministère de la Santé du Royaume du Cambodge finalise l'étude de tous les cas présumés hospitalisés. Cette étude finale a rajouté deux cas supplémentaires entre avril et le 5 juillet 2012, portant le total des enfants atteints à 59, dont 52 sont morts. L'âge des cas va de trois mois à 11 ans, avec une majorité ayant moins de trois ans. Le ratio global garçons/filles est de 1,3/1. Il n'y avait pas d'échantillons de laboratoire disponibles dans la majorité des cas, du fait qu'ils sont décédés avant d'avoir pu faire les prélèvements nécessaires.

Sur la base des derniers résultats de laboratoire, une proportion significative des échantillons a donné des tests positifs pour l'entérovirus 71 (EV-71), à l'origine de la maladie mains-pieds-bouche. On sait que ce virus peut donner lieu à de graves complications chez certains patients. De plus, un certain nombre d'autres agents pathogènes, dont le virus de la dengue et *streptococcus suis*, ont été retrouvés dans quelques-uns des échantillons. En revanche, les tests ont été négatifs pour H5N1 et les autres virus grippaux, pour le SRAS et pour le virus Nipah.

De nouvelles investigations pour rapprocher les données cliniques, celles des laboratoires et les informations épidémiologiques sont en cours et devraient se conclure dans quelques jours.

L'OMS et ses partenaires, dont l'Institut Pasteur du Cambodge et les Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis, aident le Ministère de la Santé face à cet événement.

Les autorités renforcent également la sensibilisation du public aux bonnes règles d'hygiène, dont le lavage fréquent des mains.

Quelques informations sur la maladie mains-pieds-bouche

C'est une maladie courante du nourrisson et de l'enfant. Les symptômes fréquemment observés comportent de la fièvre, des plaies douloureuses dans la bouche et une éruption cutanée avec des cloques sur les mains, les pieds, mais aussi sur les fesses.

Le plus souvent, elle est provoquée par le virus Coxsackie A16 qui, en général, donne une maladie bénigne, guérissant spontanément avec peu de complications. Mais des entérovirus peuvent aussi en être la cause, dont l'entérovirus 71 (EV71), que l'on a associé à de graves complications dans certains groupes et qui peut entraîner des décès.

La maladie mains-pieds-bouche survient chez les enfants de moins de 10 ans. La durée d'incubation entre l'infection et l'apparition des symptômes va de 3 à 7 jours.

La maladie commence habituellement par de la fièvre, un manque d'appétit, un état de malaise et, fréquemment, une irritation de la gorge. Un ou deux jours après l'apparition de la fièvre, des plaies douloureuses se développent dans la bouche. Elles commencent par de petites taches rouges qui forment des cloques puis, souvent, des ulcères. Elles se situent en général sur la langue, sur les gencives et à l'intérieur des joues. Une éruption cutanée non prurigineuse apparaît en 1 à 2 jours avec des taches rouges, plates ou surélevées, dont certaines avec des cloques.

Cette éruption se situe habituellement sur la paume des mains et la plante des pieds, mais elle peut aussi survenir sur les fesses et/ou sur les organes génitaux. Une personne atteinte de cette maladie peut être asymptomatique, n'avoir qu'une éruption cutanée ou que des ulcères buccaux. Dans un petit nombre de cas, les enfants peuvent présenter un bref épisode fébrile, des symptômes neurologiques et respiratoires et succomber rapidement.

Le virus de la maladie mains-pieds-bouche est contagieux et l'infection se propage d'une personne à l'autre par contact direct avec les sécrétions nasales ou pharyngées, la salive, le liquide des cloques ou les selles de sujets infectés. Ceux-ci sont les plus contagieux au cours de la première semaine de la maladie, mais ils peuvent le rester pendant plusieurs semaines. Cette maladie n'est pas transmise par les animaux, même de compagnie. Il ne faut pas la confondre avec la fièvre aphteuse de l'animal, une maladie tout à fait différente.

On ne dispose actuellement d'aucun traitement spécifique pour la maladie mains-pieds-bouche. Les patients doivent boire abondamment de l'eau ou d'autres liquides et peuvent nécessiter un traitement symptomatique. Il est conseillé aux agents de santé de traiter les patients en fonction de leurs symptômes et d'éviter de leur administrer des stéroïdes.

Graves complications de la maladie mains-pieds-bouche due au virus EV-71 au Cambodge – Conclusions de l'enquête conjointe

13 juillet 2012 - L'enquête sur les cas de maladie et de décès au Cambodge, concernant avant tout de très jeunes enfants, a conduit qu'une forme grave de la maladie mains-pieds-bouche était à l'origine de la majorité des cas notifiés par le Ministère de la Santé.

Des échantillons de 31 patients au total ont été prélevés et analysés par l'Institut Pasteur du Cambodge, qui a recherché un certain nombre d'agents pathogènes. La plupart se sont révélés positifs pour l'entérovirus 71 (EV-71) qui provoque la maladie mains-pieds-bouche. Une petite proportion d'échantillons a également donné des tests positifs pour d'autres agents pathogènes, dont *Haemophilus Influenzae* type B et *Streptococcus suis*. Il n'a pas été possible de faire des analyses pour tous les patients, certains étant décédés avant qu'on n'ait pu prélever les échantillons voulus.

L'enquête a comporté:

- un examen minutieux des dossiers des patients à l'hôpital Kantha Bopha, ainsi que dans d'autres établissements;
- des analyses de laboratoire;
- un suivi actif par les équipes d'intervention rapide auprès des familles affectées;
- une évaluation des données provenant du système national de surveillance.

Au total, 78 cas ont été identifiés, dont les 62 cas initiaux notifiés par l'hôpital Kantha Bopha et des cas déclarés par d'autres hôpitaux. Les investigations se sont concentrées sur 61 patients, correspondant à un critère spécifique (la définition de cas), dont 54 sont morts.

L'enquête a révélé que la plupart des cas avaient moins de 3 ans, qu'ils venaient de 14 provinces différentes et que certains d'entre eux souffraient d'affections chroniques. Un nombre important avait été traité aux stéroïdes à un moment ou à un autre de la maladie. On a montré que l'administration de stéroïdes aggravait l'état des patients infectés par le virus EV-71.

Avec l'aide de l'OMS et de partenaires, dont l'Institut Pasteur du Cambodge et les Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis, le Ministère de la Santé a mené l'enquête à la suite de la notification par l'Hôpital Kantha Bopha pour enfants d'un nombre inhabituel de cas de maladie et de décès parmi les enfants hospitalisés depuis avril 2012.

En réponse à cet événement, les centres de santé ont reçu du Ministère de la Santé l'instruction de déclarer tous les patients atteints de maladie mains-pieds-bouche. De plus, le Ministère de la Santé, aidé par l'OMS, a commencé une surveillance renforcée du syndrome neuro-respiratoire, un syndrome capital observé chez les patients atteints de la forme sévère due à EV-71. On s'attend à ce que la surveillance renforcée identifie de temps en temps dans les prochains mois de nouveaux cas de forme grave de la maladie mains-pieds-bouche.

En outre, le Ministère de la Santé élabore des directives et des cours de formation à l'intention des personnels prenant en charge des patients présentant une forme bénigne ou grave de la maladie mains-pieds-bouche. Une campagne de sensibilisation à la prévention, à l'identification et aux soins des enfants atteints de cette maladie est en cours.

FIGURE 19. Bulletins d'alerte et d'information émis par l'OMS concernant une flambée de maladie pieds-mains bouche associée à l'EV-A71 au Cambodge en Juillet 2012.

Sources :

http://www.who.int/csr/don/2012_07_09/fr/
http://www.who.int/csr/don/2012_07_13/fr/

6.4.5. Atteintes du système nerveux central (SNC)

Une majorité d'EVs peut infecter différents compartiments du SNC, mais le caractère neurotrope et la neurovirulence varient selon le génotype. Les poliovirus sont des EVs neurotropes et neurovirulents, mais un autre génotype, l'EV-A71, émerge en Asie. Le spectre des infections neuro-méningées causées par les EVs comprend par ordre croissant de fréquence : la méningite, l'encéphalite et la myélite. Leur diagnostic de certitude repose sur l'amplification moléculaire du génome viral dans le liquide céphalorachidien (LCR) ou liquide cérébrospinal (**figure 20**).

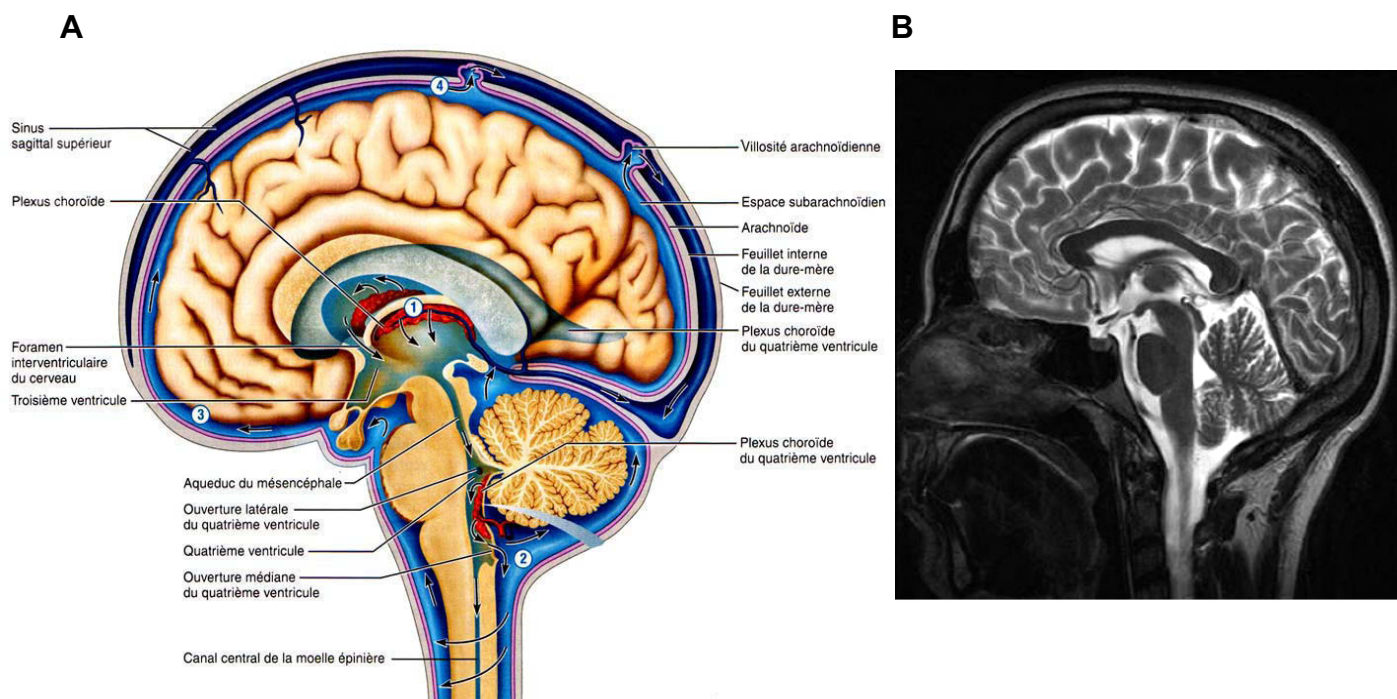


FIGURE 20. Le liquide cérébrospinal ou céphalorachidien.

Le liquide cérébro rachidien (LCR) baigne le cerveau et la moelle épinière. Son rôle est d'amortir les chocs et de participer au maintien de l'homéostasie cérébrale. L'analyse de sa composition biochimique est utilisée en clinique comme marqueur de l'état physiologique du cerveau. Le LCR est principalement produit par le plexus choroïde et il circule dans les ventricules cérébraux et les espaces sous arachnoïdiens au niveau des méninges. Situation et circulation du liquide cérébrospinal (flèches) (A). Radiographie IRM (coupe sagittale), les liquides (LCR et interstitiel) apparaissent en claire (B).

(Sources : image A, http://www.corpshumain.ca/images/Neuro_CirculCerebrospinal_F_fr.jpg ; images B, <http://www.optimind.be/blog/wp-content/uploads/2011/1/>)

6.4.5.1. Méningite aseptique

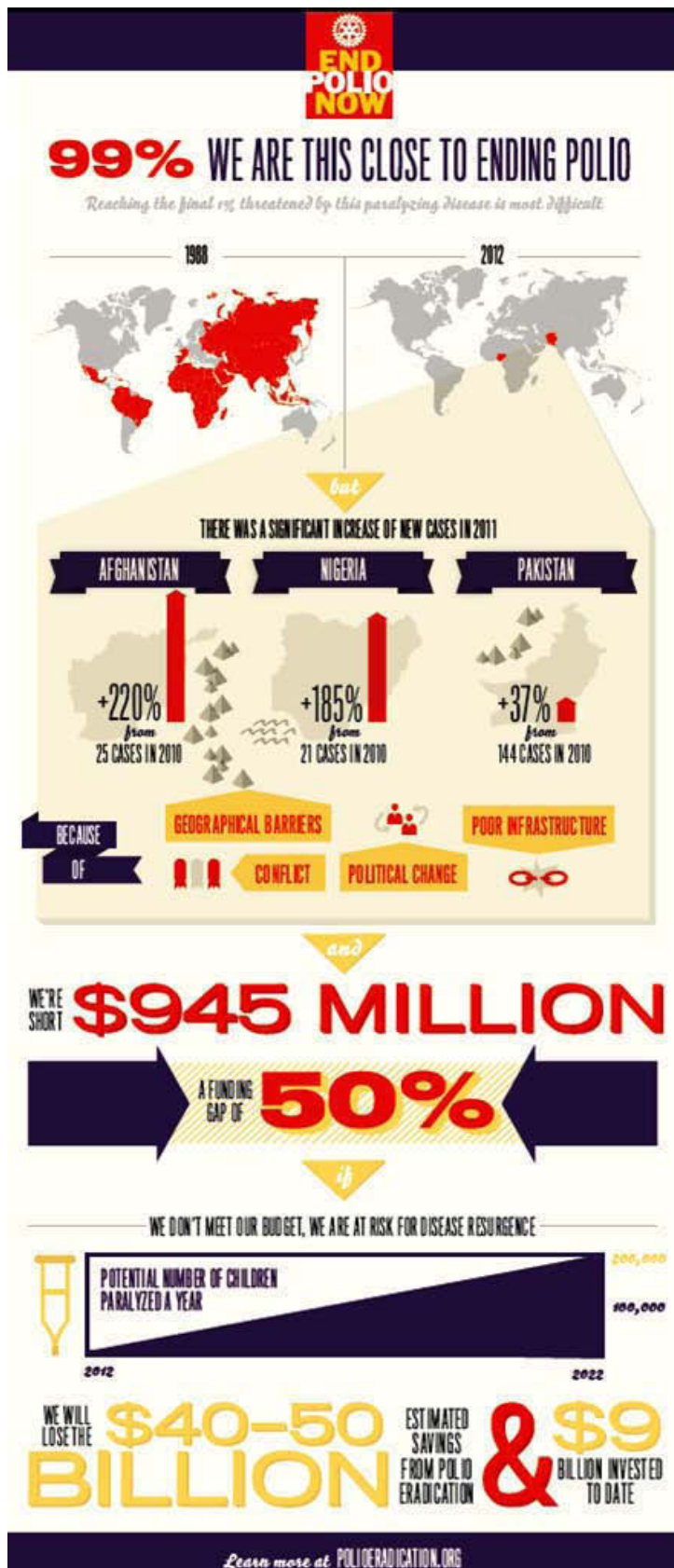
Les EVs sont les principaux agents responsables des méningites aiguës (90% des méningites virales). C'est une réaction inflammatoire des méninges au niveau de l'espace sous arachnoïdien. La méningite se traduit par une triade symptomatologique (fièvre, céphalées et raideur de nuque) souvent accompagnée de photophobies et de troubles digestifs (vomissements, nausées...) [Abzug, 2013 ; Chadwick, 2006]. Leur caractère anxiogène incite à l'hospitalisation du malade. La détection du génome viral par biologie moléculaire est la technique de référence pour le diagnostic d'une méningite à EV, quelque soit la pléiocytose et les dosages biochimiques (protéinorachie et glycorachie). Des prélèvements périphériques (gorge, selles) peuvent également être réalisés pour recherche du virus en culture. Ces analyses permettent une sortie rapide du patient [Archimbaud *et al.*, 2013]. Cette maladie présente une morbidité plus élevée chez les nouveau-nés, en particulier lorsque la contamination a lieu à la naissance et dans les premiers jours de vie [Abzug, 2013].

6.4.5.2. L'encéphalite

L'encéphalite est une urgence neurologique définie comme une inflammation du parenchyme cérébral associée à des dysfonctionnements neurologiques. Elle est souvent associée à des séquelles neurologiques graves, voire à une mise en cause du pronostic vital du patient. Elle se traduit par des céphalées, fièvres, ataxie cérébelleuse, troubles cognitifs, troubles du comportement, voir coma. Les étiologies spécifiques ne sont identifiées que dans moins de 50% des cas à cause d'un manque d'approches diagnostics standardisées, de l'hétérogénéité des cas [Venkatesan *et al.*, 2013] et de la difficulté ou impossibilité d'évaluer certains troubles comportementaux chez les enfants en bas âge. Les EVs représentent la seconde cause d'encéphalite virale après les herpesvirus et à égalité avec les arbovirus. Des encéphalites associées aux EVs ont également été observées chez des patients immunodéprimés ou sous traitement immunosuppresseur [Archimbaud *et al.*, 2003].

6.4.5.3. Myélite et poliomyélite

Les myélites correspondent à des infections de la matière grise de la moelle épinière (neurones), provoquant des céphalées fébriles, des douleurs dorsales et abdominales, et des paralysies flasques aiguës. La myélite associée aux 3 génotypes de poliovirus est la première maladie à avoir été associée aux EVs. Environ 1 à 2 % des personnes infectées avec un PV par voie digestive développent une atteinte nerveuse dont la moitié d'atteintes profondes. Elle se traduit par une infection des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière, et dans une moindre mesure des neurones du cortex moteur, du thalamus, du cervelet et du gyrus précentral. Il en résulte



une paralysie flasque asymétrique, le plus souvent des membres inférieurs, dont le degré dépendra du site et de la sévérité des lésions neuronales. Une paralysie des muscles respiratoires peut entraîner la mort. La poliomyélite est une maladie à déclaration obligatoire. Le programme mondial d'éradication de la poliomyélite par la vaccination en 1988 a permis de diminuer significativement les nombres de cas (**données de l'OMS, figure 21**). Des foyers de poliomyélites persistent dans quelques pays (Nigéria, Afghanistan et Pakistan en 2013).

FIGURE 21. Campagne pour l'éradication des derniers foyers de poliomyélite dans le monde

Source
<http://www.rotary.org/foundation/polioplus/>
 Pour
<http://www.Polioeradication.org>

6.5. Voies d'entrée des entérovirus dans le système nerveux

Les voies par lesquelles les EVs accèdent au SNC restent encore mal connues. Deux concepts ont été énoncés dans les années 50 à partir des recherches sur les PV. En 1955, David Bodian formule l'hypothèse que la présence de PV dans le sang permet l'atteinte des tissus cérébraux susceptibles, **voie virémique** [Bodian, 1955]. En 1956, Albert Sabin formule l'hypothèse selon laquelle les PV infectent les neurones afférents au niveau de ganglions nerveux puis remontent jusqu'au SNC par la **voie neuronale** [Sabin, 1956].

6.5.1. Voie neuronale : transport rétrograde axonal

En 1992, Ren et Racaniello suggèrent que les PV sont transportés le long d'un axone depuis un muscle jusqu'au SNC chez des souris transgéniques exprimant le récepteur PVR. Le récepteur PVR aurait un rôle crucial dans cette voie [Ren et Racaniello, 1992]. D'autres études sur modèle murin transgénique montrent que la fixation du PV-1 à son récepteur entraîne son internalisation par endocytose. La vésicule d'endocytose serait ensuite rapidement et efficacement véhiculée par voie rétrograde grâce à l'interaction de la partie cytoplasmique de PVR avec la chaîne légère Tctex-1 de la dynéine [Ohka *et al.*, 1998 ; 2004]. L'hypothèse de ce mode de transport a également été avancée pour l'EV-A71 [Chen *et al.*, 2007b]. Les auteurs montrent une forte diffusion de l'EV-A71 à la moelle épinière de souris susceptibles au virus après inoculation par voie orale, intra musculaire ou dans un membre inférieur. La diffusion du virus est réduite en présence de colchicine, qui bloque le transport rétrograde axonal. Les auteurs montrent aussi que les souris infectées présentent une perméabilisation transitoire de la barrière hémato encéphalique 30 heures après l'inoculation par voie orale ; elle est consécutive à la virémie et associée à l'augmentation de TNF α sérique.

Ces études présentent un certain nombre de biais et de limites. Le modèle d'étude s'appuie sur des souris rendues sensibles au virus par transfection du récepteur PVR humain. Les modèles murins présentent une faible sensibilité au PV-1 après infection par voie orale, à moins de les rendre déficients pour la réponse interféron [Ohka *et al.*, 2007]. Enfin, les souris sont inoculées généralement par voie intramusculaire, ce qui élimine la voie virémique.

L'étude réalisée par Lancaster et Pfeiffer chez des souris inoculées avec le PV-1, suggère l'existence de 3 barrières majeures au transport rétrograde axonale : (1) la réponse interféron, qui limite l'infection dans le système nerveux périphérique, (2) la multiplication limitée du PV-1 dans les neurones périphériques d'origine murine, (3) le faible nombre de particules virales transportées par la voie axonale rétrograde, malgré sa rapidité. Ce transport est augmenté par une injection intra musculaire. Lancaster et Pfeiffer comparent le transport rétrograde axonal du PV à « *un très long grand-huit, dont les voitures dépourvues de ceinture perdraient la majorité de leurs passagers le*

long du circuit ». Ceci expliquerait, d'après les auteurs, la très faible proportion de patients infectés par le PV-1 développant une poliomyélite [Lancaster et Pfeiffer, 2010].

6.5.2. Virémie et franchissement de la barrière hémato encéphalique

A la différence du transport rétrograde axonal, l'atteinte du SNC par la voie virémique a été très peu explorée. La première étude expérimentale qui aborde la question a été publiée par une équipe japonaise en 1997 [Yang *et al.*, 1997]. Différentes souches de PV-1 marquées radioactivement ont été inoculées par voie intraveineuse à des souris transgéniques pour le récepteur PVR. Les souches testées incluaient la souche sauvage virulente Mahoney, la souche vaccinale atténuée Sabin-1, une souche Mahoney recombinante pour les gènes de structure de la souche Sabin et la construction réciproque. Les résultats montrent que la neurovirulence du PV-1 n'est pas associée à ses protéines de capsid : la neurovirulence de la souche Mahoney recombinante est équivalente à celle de la souche Mahoney sauvage et la souche Sabin recombinante est peu neurovirulente comme la souche Sabin parentale. Après inoculation intra veineuse, toutes les souches s'accumulent dans le SNC avec des taux identiques, aussi bien chez les souris transgéniques permissives que chez les souris non transgéniques. Cette accumulation est même 100 fois supérieure à celle de l'albumine utilisée comme témoin d'étanchéité de la BHE. Les auteurs concluent que le PV-1 peut atteindre le SNC par un franchissement de la BHE sans l'implication de son récepteur PVR. Ce franchissement ne se produit pas par un processus de cheval de Troie médié par des monocytes infectés. L'absence d'altération de l'étanchéité de la BHE (au moins jusqu'à 72h après l'inoculation) ne suggère pas une infection lytique de la BHE.

7. La barrière hémato encéphalique

7.1. Histoire

La découverte d'une barrière entre le sang et le SNC a été faite en 1885 par le chercheur allemand Paul Ehrlich. Il a mis en évidence que certains colorants hydrosolubles injectés dans le système circulatoire colorent tous les organes à l'exception du cerveau et de la moelle épinière. Il en a conclu à tort que ces colorants présentaient une faible affinité pour le système nerveux. En 1909, un étudiant de Erlich, Edwin Goldmann réitère l'expérience, mais en injectant les colorants dans le LCR : son observation est exactement opposée, ce qui suggère la présence d'une barrière étanche isolant le système nerveux de la circulation sanguine. A la même époque, un autre chercheur allemand, Lewandowsky, qui étudiait la pénétration de ferrocyanate de potassium dans le cerveau,

introduisit en 1900 le terme « bluthirnschranke » de l'allemand : die Schranke (barrière), das Hirn (cerveau) et das Blut (sang) littéralement barrière sang cerveau ou barrière hémato encéphalique (BHE). C'est à partir des années 1960 avec les avancées de la microscopie électronique que débuta l'étude de la structure tissulaire de cette barrière par l'injection d'un traceur dans le sang ou le cerveau (**figure 22**) [Reese et Karnovski, 1967]. Ces expériences ont montré que la BHE est une structure fine localisée au niveau de microvaisseaux cérébraux et composée de cellules endothéliales non fenêtrées. De plus, cette barrière endothéliale stoppe le traceur au niveau des espaces intercellulaires caractérisés par des jonctions serrées. **Reese et Karnovski (1967)** font ressortir que l'étanchéité paracellulaire permise par les jonctions de l'endothélium microvasculaire cérébral peut contenir des gradients de traceur 3 fois supérieurs à ce qui est suffisant pour permettre la diffusion dans le cœur ou le muscle squelettique chez la souris. Depuis de nombreux modèles *in vitro*, *in et ex vivo* de BHE ont été proposés.

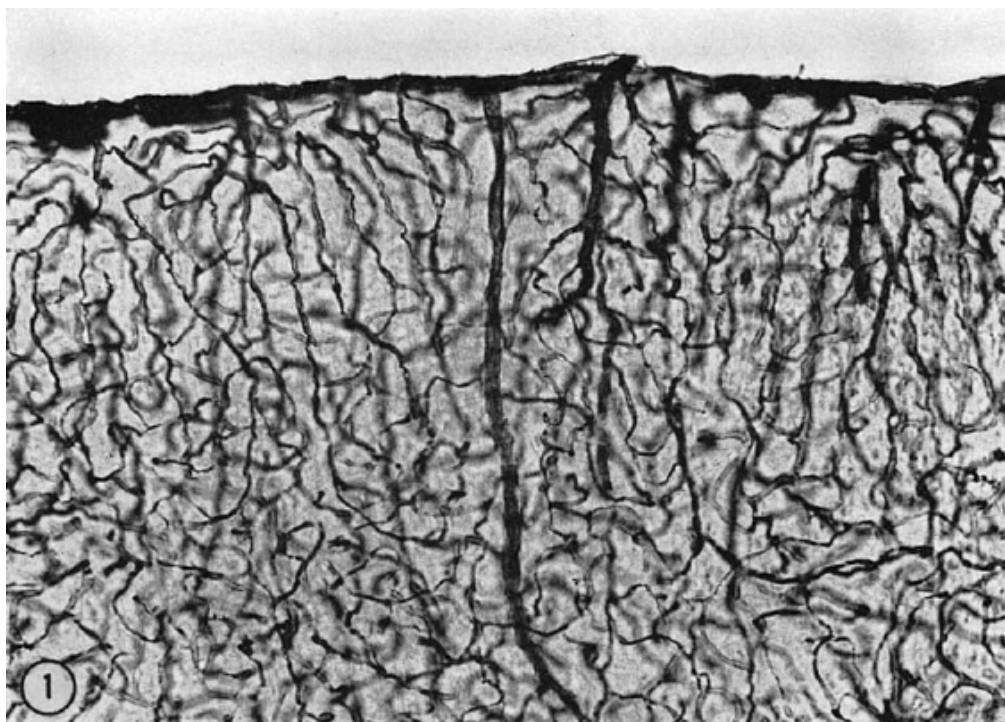


FIGURE 22. Cortex cérébral de Souris après administration intra veineuse d'un marqueur Horseradish peroxydase.

Le marqueur (noir) est retrouvé uniquement dans les vaisseaux sanguins et non dans le parenchyme cérébral, d'où la présence d'une barrière vasculaire étanche. Grossissement 175X. (D'après **Reese et Karnowski, 1967**).

7.2. Rôle physiologique

Le SNC est séparé du sang et du reste de l'organisme par 3 barrières [Abbott *et al.*, 2006 ; Oreskovic et Klarica, 2010 ; Engelhardt et Coisne, 2011 ; Obermeir *et al.*, 2013]. (1) Les plexus choroïdes au niveau des ventricules cérébraux, qui participent à la sécrétion et à la circulation du LCR. Ils constituent une double barrière formée d'un endothélium fenestré non restrictif séparant le sang artériel du plexus choroïde et d'un épithélium choroïdien séparant le plexus choroïde du LCR ventriculaire. (2) La barrière hémato lepto-méningée au niveau des méninges, qui délimite les gros vaisseaux sanguins (veines) traversant les espaces sous arachnoïdiens, contenant le LCR. (3) Les microvaisseaux cérébraux (capillaires et post capillaires) qui vascularisent le parenchyme cérébral profond et sont délimités par la BHE.

La BHE est une unité physiologique, qui constitue l'immense majorité de l'interface sang/cerveau et exerce le plus fort contrôle sur le micro environnement cérébral. Ses principales fonctions sont : (1) maintenir l'homéostasie cérébrale en s'opposant à la diffusion passive de composés du sang vers le SNC, ce qui consiste à assurer un flux continu, sélectif et dosé de nutriments vers le cerveau et à éliminer les déchets métaboliques cérébraux vers le sang. (2) Protéger le SNC de l'environnement extra cérébral (y compris les agents pathogènes) [Abbott *et al.*, 2006 ; Cecchelli *et al.*, 2007 ; Cardoso *et al.*, 2010 ; Obermeir *et al.*, 2013]. (3) Favoriser l'infiltration vers le système nerveux de leucocytes lors des réponses immunitaires [Engelhardt et Coisne, 2011].

7.3. Anatomie tissulaire

Les microvaisseaux cérébraux (capillaires et post capillaires) sont tapissés d'un revêtement ininterrompu et non fenestré de cellules endothéliales cérébrales, soudées par des jonctions serrées, lui conférant une très forte étanchéité paracellulaire. Avec les péricytes, les cellules endothéliales reposent sur une lame basale endothéliale de matrice extra cellulaire. Sur cette lame basale endothéliale viennent se connecter des cellules gliales de type astrocytes qui génèrent une lame basale gliale (*glia limitans perivascularis*), l'ensemble enrobe les microvaisseaux. Au niveau des microvaisseaux capillaires, les 2 ensembles sont en contact direct [Cardoso *et al.*, 2010]. Au niveau microvaisseaux post-capillaires, ils bordent un fin espace périvasculaire [Engelhardt et Coisne, 2011 ; Obermeir *et al.*, 2013]. Des études réalisées sur des modèles murins de BHE indiquent que cet espace périvasculaire contient du LCR et/ou du liquide interstitiel, lequel est drainé vers les ensembles sous arachnoïdiens et leptoméningés [William *et al.*, 2001 ; Oreskovic et Klarica, 2010]. Les cellules vasculaires, gliales et la matrice extracellulaire forment l'unité neurovasculaire de la BHE à laquelle viennent se connecter les terminaisons neuronales et des cellules immunitaires

périvasculaires ou de la microglie (**figure 23**) [Abbot *et al.*, 2006 ; Alvarez *et al.*, 2013 ; Obermeier *et al.*, 2013].

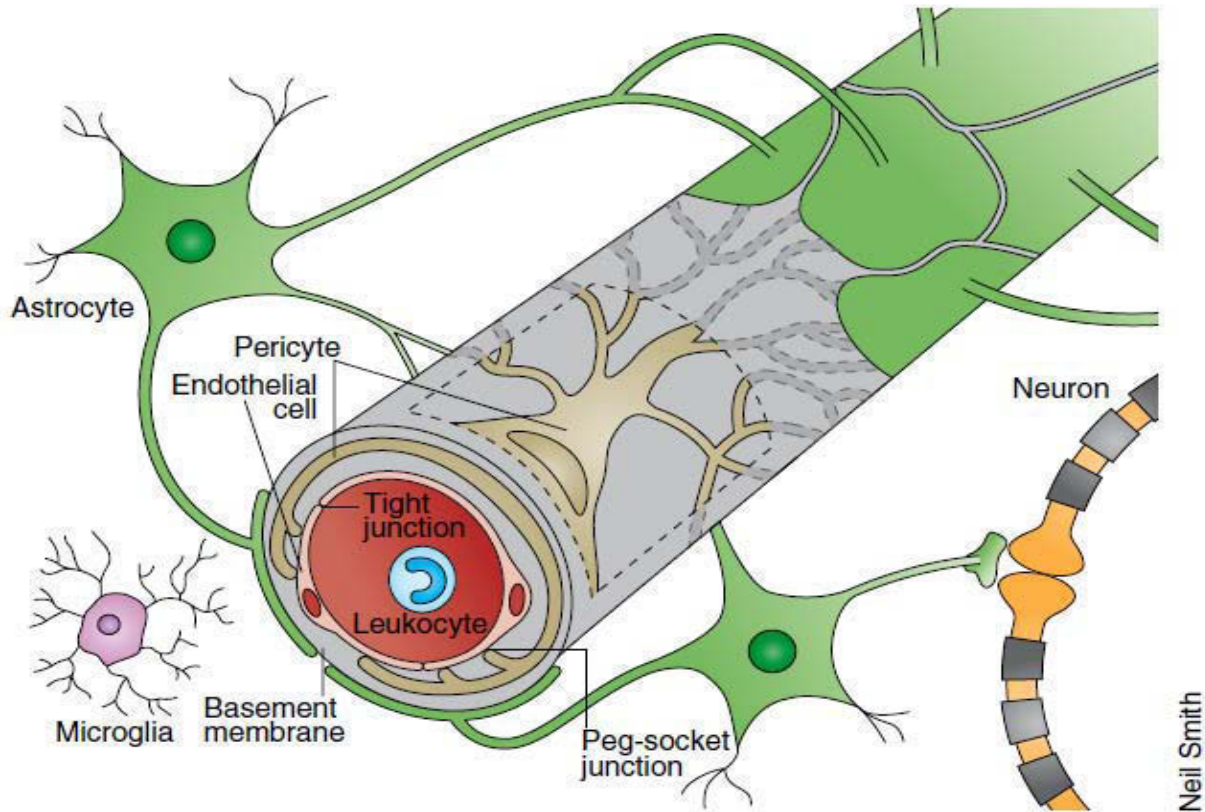


FIGURE 23. Unité neurovasculaire de la barrière hémato encéphalique.

Au niveau des microvaisseaux cérébraux, les cellules endothéliales microvasculaires forment un endothélium continu, non fenestré et scellé par des jonctions serrées. La face abluminale de ces cellules endothéliales repose sur une lame basale composée de 3 feuillets de matrice extra cellulaire en relation avec des péricytes et contre laquelle vient se connecter des pieds astrocytaires. Au niveau des microvaisseaux post-capillaires (veinules), les cellules endothéliales et les astrocytes sont séparés par un fin espace périvasculaire rempli de liquide interstitiel ou cérébrospinal. (D'après Obermeier *et al.*, 2013).

7.3.1. Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales

Les principales propriétés de la BHE sont conférées par les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Elles se caractérisent par une absence de fenestrations et de pinocytose (transcytose aspécifique). Des jonctions serrées spécifiques aux espaces intercellulaires assurent une très forte étanchéité paracellulaire et imposent un trafic transcellulaire des molécules. Le degré de

fermeture des jonctions est modulé *via* les connexions des cellules endothéliales avec les autres constituants du complexe neurovasculaire [Abbot *et al.*, 2006 ; Obermeir *et al.*, 2013 ; Cardoso *et al.*, 2010 ; Hamm *et al.*, 2004 ; Hatherell *et al.*, 2011]. Ces cellules endothéliales ne constituent pas seulement un mur, elles se caractérisent aussi par l'expression membranaire polarisée de récepteurs et de transporteurs actifs, qui assurent le passage sélectif des nutriments indispensables vers l'espace périvasculaire cérébral et elles éliminent les déchets cérébraux vers le sang [Weksler *et al.*, 2005 ; Gosselet *et al.*, 2008]. Enfin, du fait de la dépendance énergétique de ces transporteurs et des contraintes liées aux deux environnements physico-chimiques différents (sang et cerveau), une importante activité métabolique est nécessaire et se traduit par un grand nombre de mitochondries, qui représentent 8 à 11% du cytoplasme [Oldendorf *et al.*, 1977].

7.3.2. Les péricytes

Les péricytes s'enroulent autour des microvaisseaux où ils établissent des contacts étroits avec les cellules endothéliales. Ces cellules sont contractiles et partagent des propriétés avec les muscles lisses des gros vaisseaux, comme la présence d'actine α . De façon similaire aux muscles lisses, ils peuvent moduler le flux sanguin au niveau des capillaires par vasodilatation ou constriction en réponse à une stimulation adrénergique ou cholinergique [Bergers et Song, 2005]. Par ailleurs, les cellules endothéliales peuvent influencer les péricytes et induire une vasodilatation par sécrétion de monoxyde d'azote (NO).

Au niveau de l'endothélium microvasculaire cérébral, dont ils recouvrent entre 22 et 32% de la surface, les péricytes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la BHE [Bergers et Song, 2005 ; Obermeir *et al.*, 2013 ; Cardoso *et al.*, 2010 ; Hatherell *et al.*, 2011]. Ils participent à l'entretien de la lame basale endothéliale, à l'induction des jonctions serrées endothéliales, et ils protègent la barrière d'une destruction par hypoxie plus efficacement que les astrocytes [Al Ahmad *et al.*, 2009]. Les péricytes participeraient également à des mécanismes immunitaires en acquérant des phénotypes de pseudo macrophages (pinocytose, phagocytose), de cellules présentatrices d'antigènes, et de senseurs de l'intégrité du SNC en collaboration avec la microglie [Bergers et Song, 2005].

7.3.3. Les lames basales

Les lames basales sont un constituant essentiel de l'intégrité de la BHE. Elles se composent de différents éléments matriciels générés par les cellules du complexe neurovasculaire [Abbot *et al.*, 2006 ; Obermeir *et al.*, 2013 ; Cardoso *et al.*, 2010 ; Alvarez *et al.*, 2013]. Ces éléments matriciels comprennent : des protéines de structure (collagène type IV et élastine), des protéines de

liaison et de connexion (fibronectine et laminine), des protéoglycanes, des glycoprotéines et des récepteurs d'adhésion cellule/matrice.

- La lame basale endothéliale est composée de laminine 4 et 5, de collagène IV et de fibronectines. Elle est produite par les cellules endothéliales et les péricytes, qu'elle encercle.
- La lame basale parenchymateuse est composée de lamine 1 et 2. Elle est produite par les astrocytes, et forme avec ces derniers la *Glia limitans perivascularis*.
- Au niveau des micro-capillaires, ces 2 lames basales sont accolées l'une à l'autre par une 3^e couche composée de collagène IV, et respectivement produites par les astrocytes et les cellules endothéliales.

La modulation des lames basales (par extension de l'intégrité de la BHE) est assurée par un équilibre entre les protéases de la famille des matrices métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs, les « tissue inhibitor of metalloproteases » (TIMP).

7.3.4. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales qui émettent des prolongements dont les terminaisons – pieds astrocytaires – forment un manchon entourant plus de 90% des microvaisseaux. D'autres prolongements astrocytaires s'associent aux axones des neurones voisins, de sorte que les astrocytes serviraient d'intermédiaires entre les microvaisseaux et les neurones [Cardoso *et al.*, 2010]. L'induction, la maturation et le maintien des propriétés de la BHE sont réalisés soit par contact direct des pieds astrocytaires, soit par induction paracrine *via* la sécrétion de facteurs comme « Angiopoétin-1 » ou -2 (ANG-1 ou -2), l'angiotensine II, le « basal Fibroblast Growth Factor » (bFGF), le « Glial Derived Neurotrophic Factor » (GDNF), le « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β), le « vascular endothelial growth factor (VEGF), l'acide rétinoïque (RA), le « sonic hedgehog » (shh) (figure 24) [Abbot *et al.*, 2006 ; Obermeir *et al.*, 2013 ; Hatherell *et al.*, 2011 ; Alvarez *et al.*, 2013].

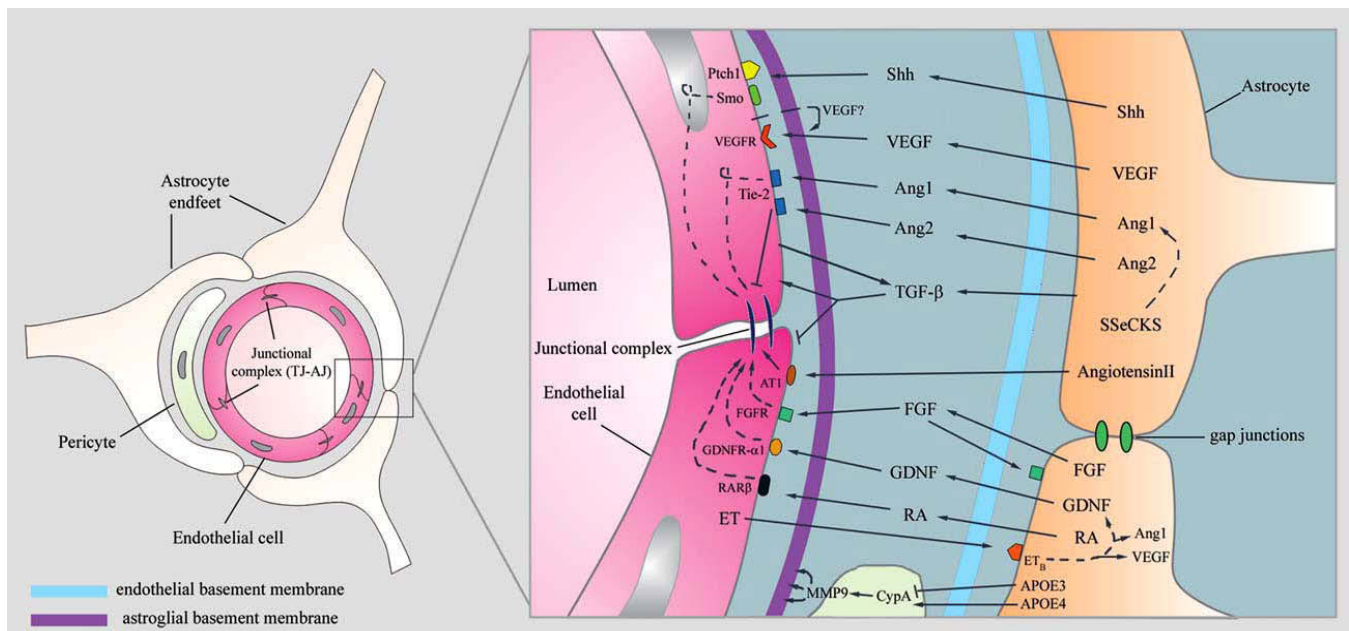


FIGURE 24. Maintien des propriétés de la barrière hémato encéphalique par la sécrétion de facteurs entre les cellules endothéliales et les astrocytes.

Abréviations et légendes : Ang-1-2 (angiopoietine 1 et 2), ApoE3-E4 (apolipoprotéine E3 et E4), AT1 (récepteur angiotensine type 1), CypA (cyclophiline A), ET (endotheline), FGF (fibroblast growth factor) GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9), Ptch1 (Patched 1), RA (acide rétinoïque), RARb (RA-récepteur b), Shh (Sonic Hedgehog), Smo (Smoothed), SSeCKS (Src suppressed C kinase substrate), TGFb (transforming growth factor-b), Tie2 (récepteur tyrosine kinase 2) et VEGF (Vascular endothelial growth factor). (→) activations / inductions, (⊥) inhibitions ou régulations négatives. (D'après Alvarez *et al.*, 2013).

Veillez noter sur cette figure la représentation d'un espace périvasculaire entre l'endothelial basement membrane et l'astroglial basement membrane.

7.3.5. Les neurones

Les relations qu'entretiennent les neurones avec la BHE sont mal connues. Ils entrent en contact avec la BHE par le biais des astrocytes ou par contact avec les terminaisons neuronales au niveau des cellules endothéliales. Leur rôle serait de moduler les propriétés de la BHE pour réguler localement le débit sanguin en réponse à des variations de leur micro environnement [Cardoso *et al.*, 2010 ; Obermeir *et al.*, 2013].

7.3.6. Les cellules immunitaires

Différentes cellules immunitaires sont localisées au niveau de la BHE et jouent un rôle de sentinelle. Une première ligne de défense est assurée par des macrophages et des cellules dendritiques périvasculaires. Localisées entre la glia limitans et l'endothélium cérébral, ces cellules forment une population hétérogène et ont des rôles multiples : phagocytose des débris cellulaires, détection d'une atteinte neuronale, présentation d'antigènes [Williams *et al.*, 2001]. Des études

menées chez des rats montrent que ces cellules périvasculaires sont continuellement renouvelées à raison de 30% tous les 3 mois en conditions non inflammatoires [Williams *et al.*, 2001]. La microglie constitue 10% de la population cérébrale. Ce sont des macrophages cérébraux, qui assurent un rôle primordial dans la réponse immunitaire du SNC et de la moelle épinière. Ils deviennent actifs en réponse à des perturbations physiologiques ou pathologiques et deviennent alors des cellules présentatrices d'antigène dont la sécrétion de cytokines pro inflammatoires peut moduler l'étanchéité de la BHE. [Aguzzi *et al.*, 2013].

7.4. Les jonctions inter cellulaires

Les propriétés d'étanchéité paracellulaire de l'endothélium microvasculaire cérébral sont déterminées par un complexe de jonctions inter cellulaires comprenant des jonctions serrées et des jonctions d'adhérences (**figure 25**) [Nagy *et al.*, 1984 ; Stamatovic *et al.*, 2008 ; 2012 ; Cardoso *et al.*, 2010]. Ces jonctions sont formées de protéines transmembranaires ou intracellulaires, qui interagissent entre elles par des interactions homophiles ou hétérophiles. Les protéines de jonctions serrées verrouillent les espaces intercellulaires apicaux aux molécules et aux ions. Cette étanchéité peut être expérimentalement mise en évidence *in vitro* par la mesure de la clairance de composés non internalisés par les cellules ou par une haute résistance électrique transendothéliale (TEER) de 1500-2000 $\Omega \text{ cm}^2$ *in vivo*. Les protéines de jonctions d'adhérence stabilisent les espaces au niveau des pôles basolatéraux.

7.4.1. Les protéines de jonctions serrées

- Les claudines forment une famille de 24 membres (claudines 1 à 24) identifiée à partir de 1998 [Furuse *et al.*, 1998]. Ce sont des protéines de 22 kDa à quatre domaines transmembranaires, dont les extrémités cytoplasmiques Cter et Nter sont connectées aux protéines ZO (*zonula occludens*). Les domaines extracellulaires forment 2 boucles, qui vont interagir avec celles d'une claudine adjacente et former un dimère homophile. La distribution des 24 types de claudines est dépendante du tissu. Les claudines-2 et 3 (anciennement 1), 5, 11, 12 et 18 sont exprimées chez les cellules endothéliales cérébrales microvasculaires des mammifères. En particulier, ce sont les claudines-3 et 5 (éventuellement 12) qui établissent les propriétés d'étanchéité de la BHE [Cardoso *et al.*, 2010 ; Liebner *et al.*, 2000 ; Wolburg et Lippoldt, 2002]
- Les occludines sont les premières protéines de jonctions serrées à avoir été identifiées [Furuse *et al.*, 1993]. Ces protéines (65 kDa) ont 4 domaines transmembranaires, leurs extrémités Cter et Nter cytoplasmiques sont reliées aux protéines ZO. L'occludine ne serra

pas directement impliquée dans la restriction paracellulaire comme la claudine, mais régulerait les propriétés de la BHE [Cardoso *et al.*, 2010 ; Stamatovic *et al.*, 2008 ; Wolburg et Lippoldt 2002].

- Les protéines accessoires telles ZO-1, 2 et 3 appartiennent à la famille des « membran-associated guanylate kinase-like proteins » (MAGUK). Elles partagent des domaines communs : 3 domaines PDZ impliqués dans la liaison aux extrémités Cter des protéines transmembranaires [Furuse *et al.*, 1994] ; un domaine SH3 qui lie des protéines de signalisation et des éléments du cytosquelette ; un domaine guanylate cyclase. La protéine ZO-1 est la plus exprimée dans l'endothélium cérébral microvasculaire [Cardoso *et al.*, 2010 ; Stamatovic *et al.*, 2008 ; Itoh *et al.* 1999].

7.4.2. Les protéines de jonctions d'adhérence

La famille des protéines JAM comprend JAM-1, JAM-2, et JAM-3 (ou A, B et C). Ce sont des protéines de 40 kDa de la superfamille des IgG. Ce sont des protéines à un domaine transmembranaire, avec des interactions homophiles des domaines extracellulaires. Elles participent au maintien des jonctions serrées et, lors de conditions inflammatoires, elles favorisent également la migration paracellulaire des leucocytes par leur redistribution au pôle apical [Cardoso *et al.*, 2010 ; Stamatovic *et al.*, 2008 ; 2012 ; Ostermann *et al.*, 2002].

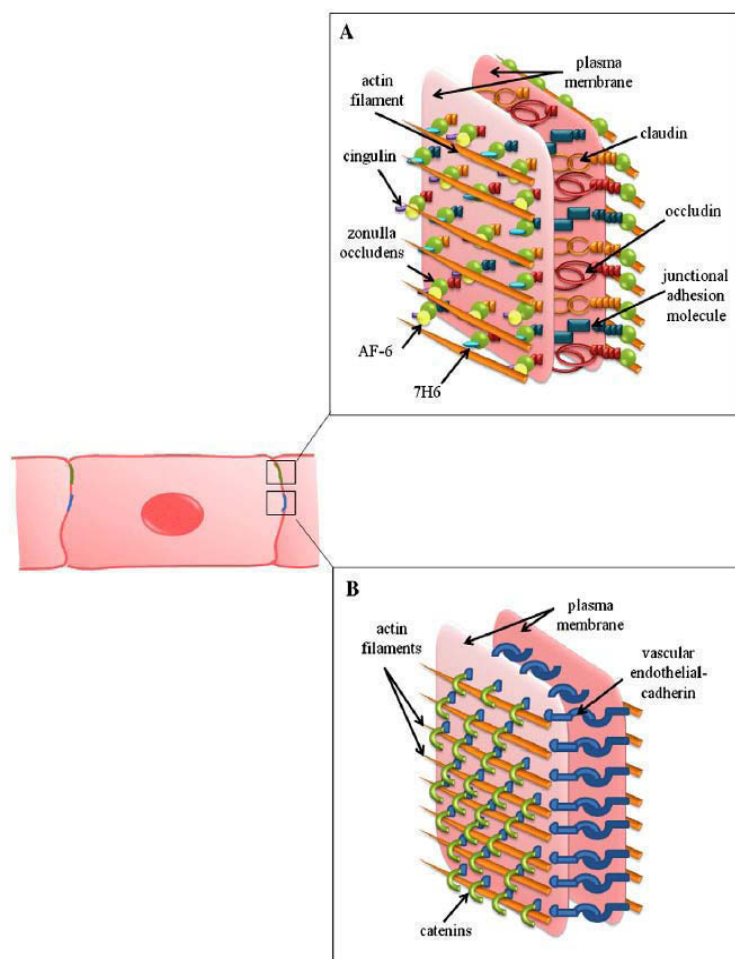


FIGURE 25. Jonctions inter cellulaires endothéliales.

Les cellules endothéliales sont connectées les unes aux autres par un système complexe de jonctions intercellulaires, qui assurent à la fois la régularité et l'étanchéité de l'endothélium. Au niveau de la région apicale, les espaces intercellulaires sont scellés par des jonctions serrées formées de protéines transmembranaires (claudines, occludines et JAM), dont les extrémités cytoplasmiques sont reliées au cytosquelette d'actine par des rivets moléculaires, les protéines ZO zonula occludens (A). Au dessous des jonctions serrées, les espaces intercellulaires sont connectés par des jonctions d'adhérence (B). (D'après Cardoso *et al.*, 2010)

7.4.4. Rôle du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine des cellules endothéliales constitue également un facteur de l'intégrité des jonctions serrées. Il est connecté aux protéines transmembranaires de jonctions serrées par l'intermédiaire de protéines accessoires qui forment de véritables rivets moléculaires [Wolburg et Lippoldt, 2002]. Cette connexion jonctions serrées/cytosquelette participe au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BHE en contribuant aux forces de tensions [Stamatovic *et al.*, 2008]. Une altération du cytosquelette peut contribuer à (ou être la résultante de) une dysfonction des jonctions serrées. Un certain nombre de virus, qui infectent les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales entraînent une perméabilisation de la BHE en partie par la destruction ou le détournement du cytosquelette d'actine [Spindler et Hsu, 2012 ; Taylor *et al.*, 2012].

7.5. Médiation de l'immunité cérébrale

7.5.1. Immunité du SNC

Le SNC bénéficie d'un relatif privilège immunitaire [Engelhardt et Coisne, 2011]. Il est dépourvu de réseau lymphatique et il est relativement imperméable aux cytokines et anticorps [Cardoso *et al.*, 2010]. A l'exception des cellules endothéliales cérébrales, en contact avec le sang, les cellules du SNC n'expriment pas de récepteur de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les récepteurs CMH-II ne sont exprimés qu'en conditions inflammatoires par les cellules cérébrales qui ont une fonction de présentatrices d'antigène. Il y a une pénétration limitée de monocytes, *via* une légère adhérence à la surface des barrières endothéliales grâce à une faible expression apicale de sélectines [Williams *et al.*, 2001]. Ces monocytes vont former la population périvasculaire. Des lymphocytes T mémoires peuvent patrouiller dans le LCR et le parenchyme cérébral lors d'infections [Wakim *et al.*, 2010]. Ce passage de leucocytes, certes limité, peut être le cheval de Troie de certains pathogènes pour atteindre le SNC [Spindler et Hsu, 2012]. Enfin, le SNC dispose de sa propre population immunitaire représentée par la microglie [Aguzzi *et al.*, 2013].

7.5.2. Rôle immunitaire de la BHE

Certaines équipes travaillant sur l'immunité cérébrale, plus particulièrement sur la sclérose en plaque (modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune), décrivent la BHE comme « un rempart médiéval protégeant le donjon cérébral ». Ce mur serait formé sur sa face tournée vers le sang des cellules endothéliales cérébrales microvasculaires. Sur sa face cérébrale, ce mur porte la *glia*

limitans et s'ouvre sur l'espace périvasculaire contenant le LCR qui abrite les sentinelles représentées par les cellules périvasculaires [Engelhardt et Coisne, 2011].

En condition pathologique, la BHE assure un rôle d'alarme contre une agression, mais aussi de plateforme pour la migration des leucocytes. La réaction inflammatoire va induire une perméabilisation de la BHE, ainsi qu'une transmigration facilitée des leucocytes (lymphocytes T cytotoxiques ou auxiliaires ; cellules présentatrices d'antigènes). Les médiateurs pro inflammatoires activent les cellules endothéliales et conduisent à l'augmentation de l'expression apicale de protéines d'adhésion leucocytaire : E et P-selectine, ICAM1, VCAM1, JAM, etc. De plus, les cellules endothéliales peuvent également sécréter diverses cytokines, notamment IL-1/6 ou TNF α . Un environnement pathologique va également stimuler une production de métalloprotéases de matrice (MMP) qui vont fragiliser les lames basales et faciliter la migration des leucocytes [voir § 7.9. ; Dobbie *et al.*, 1999 ; Ostermann *et al.*, 2002 ; Alvarez *et al.*, 2013].

7.5.3. Migration trans-BHE des leucocytes

L'expression des facteurs d'adhérence à la surface des cellules endothéliales permet aux leucocytes circulants de s'arrimer et d'initier leur roulement à la surface de l'endothélium vasculaire (tethering et rolling). Ce roulement va être ralenti par le gradient de concentration des facteurs d'adhérence, notamment ICAM, VCAM et ELAM (E-selectine). Les leucocytes adhérents traversent ensuite la barrière endothéliale par voie paracellulaire ou bien par voie transcellulaire [Engelhardt et Coisne, 2011 ; Cardoso *et al.*, 2010]. Pour initier leur transmigration, les leucocytes émettent des podosomes qui « tâtent » la surface de la cellule endothéliale et repèrent la zone de moindre résistance pour former un pore transcellulaire [Carman *et al.*, 2007 ; Carman et Springer, 2008]. Après le franchissement de la barrière endothéliale, les leucocytes rencontrent les cellules présentatrices d'antigènes résidentes et préparent la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les leucocytes infiltrés sécrètent des MMP ciblant les composants (laminine 1 et 2) de la *glia limitans perivascularis* pour accéder au SNC.

7.6. Systèmes expérimentaux de BHE

Il existe différents modèles expérimentaux de BHE : *in* ou *ex vivo* et *in vitro*. Chacun présentent des avantages et des inconvénients à prendre en compte selon les objectifs de l'étude envisagée [pour revue : Cardoso *et al.*, 2010 ; Cecchelli *et al.*, 2007].

7.6.1. Modèles animaux

Ces modèles ont l'avantage d'étudier les propriétés de la BHE dans l'ensemble du cerveau mais, outre l'investissement matériel et financier, certains mécanismes spécifiques sont difficilement transposables à l'homme. Par exemple, l'étude de la physiopathologie de certains pathogènes strictement humains nécessite des modèles animaux rendus permissifs par transgénèse, donc potentiellement biaisés. Les modèles animaux sont principalement utilisés dans l'étude du métabolisme de la BHE et en pharmacologie, pour tester le passage de principes actifs dans le SNC.

7.6.2. Modèle humain *ex vivo*

Ce type de modèle consiste à utiliser des microvaisseaux humains isolés lors d'autopsies ou d'excisions chirurgicales. Ce système représente en soit le meilleur modèle humain pour l'étude de l'homéostasie et des fonctions de la BHE, ainsi que de la physiopathologie de certaines maladies infectieuses. Il est limité par la disponibilité des pièces chirurgicales et la relative courte durée de leur utilisation.

7.6.3. Modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont majoritaires pour la facilité de leur utilisation et ils sont largement accessibles. Ce sont des reconstructions de l'endothélium cérébral par la culture des cellules endothéliales microvasculaires sur des membranes microporeuses. Le système complet permet de disposer d'un modèle d'étude à 2 compartiments (luminal et abluminal) séparés par le pseudo endothélium. Ce modèle peut être optimisé par la co- ou tri-culture d'astrocytes et/ou de péricytes qui permettent de se rapprocher davantage des propriétés d'une BHE [Hatherell *et al.*, 2011]. Des systèmes de culture plus complexes permettent également de mimer le flux sanguin, ce qui a pour effet d'améliorer la pertinence et la dynamique du modèle [Cucullo *et al.*, 2008] (figure 26). Différents types de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales isolées chez l'homme ou chez l'animal peuvent être utilisés.

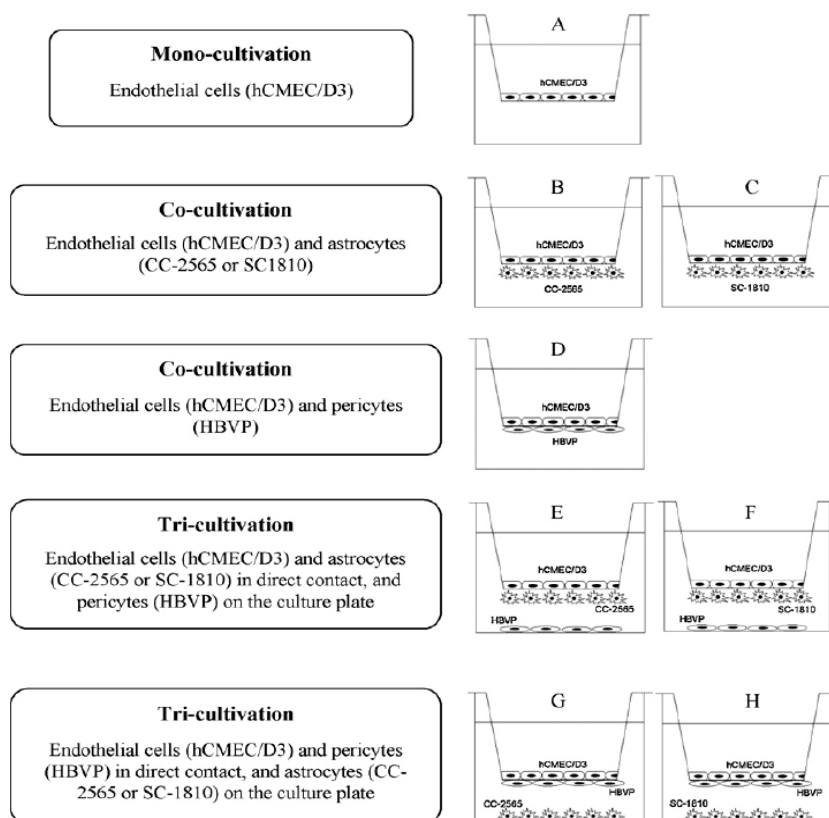
7.6.3.1. Cellules primaires

Les cellules endothéliales primaires retiennent la plupart des propriétés morphologiques et biochimiques qui caractérisent la BHE. Le micro environnement cérébral qui influe sur ces propriétés (voir ci-dessus) et l'origine cérébrale d'isolement peuvent être une source de variabilité. De plus, malgré des protocoles d'isolement précis, les cellules primaires sont généralement associées à d'autres types cellulaires [eg. Bernas *et al.*, 2010].

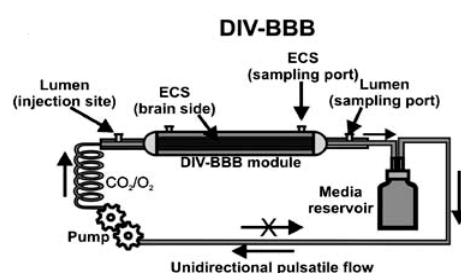
7.6.3.1. Lignées immortalisées

Plusieurs lignées de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales immortalisées sont disponibles, par exemple HBMEC [Stins *et al.*, 2001] ou hCMEC/D3 [Weksler *et al.*, 2005]. L'immortalisation des cellules est réalisée par transduction de vecteurs introduisant le gène d'une télomérase ou de l'antigène T du SV40. L'immortalisation permet une utilisation plus souple et à long terme, sous réserve qu'elle soit limitée en nombre de passages.

A



B



Characteristics

- Dimensions: 135mm x 9mm x 9mm
- Capillary number: 50
- Capillary length: 13 cm
- Pore size: $\approx 0.5\mu\text{M}$
- Wall thickness: $150\mu\text{M}$
- Inner diameter: $330\mu\text{M}$
- Diameter: $630\mu\text{M}$
- Capillary surface area: 128.5 cm^2
- Lumen surface area: 67.3 cm^2
- Lumen volume: 0.5 ml
- Cells inoculation (ECS): $\approx 4 \times 10^4$
- Cells inoculation (Lumen): $\approx 6 \times 10^4$
- ECS sampling port: 2
- Lumen sampling port: 2
- Through connectors
- Intraluminal Flow: YES

FIGURE 26. Modèles *in vitro* de barrière hémato encéphalique.

La majorité des modèles *in vitro* de barrière hémato encéphalique sont obtenus par culture des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sur des surfaces microporeuses montées sur des systèmes d'insert. Le modèle peut être perfectionné par la co- ou tri-cultures des cellules endothéliales avec des cellules péricytes et astrocytes (A). (D'après Hatherell *et al.*, 2011). Un autre modèle *in vitro* de barrière hémato encéphalique utilise des faisceaux de fibres poreuses sur lesquels sont cultivées les cellules endothéliales. Un flux pulsatile de milieu de culture, mime le débit sanguin (B). (D'après Cucullo *et al.*, 2008).

7.7. La lignée hCMEC/D3

7.7.1. Développement

Cette lignée cellulaire a été établie dans l'équipe du Dr. Pierre-Olivier Couraud de l'institut Cochin [Weksler *et al.*, 2005]. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales proviennent d'une zone excisée du lobe temporal d'une femme épileptique au Royaume-Uni. Après élimination des méninges et des vaisseaux de surface, le tissu cérébral a subi une digestion enzymatique (collagénase/dispase) et les microvaisseaux ont été isolés par centrifugation en gradient de densité. Les microvaisseaux ont ensuite subi une seconde digestion enzymatique, puis leurs fragments ont été mis en culture dans un milieu sélectif pour cellules endothéliales. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires (hCMEC) isolées furent immortalisées par la double transduction de lentivecteurs permettant l'expression de la télomérase hTERT (élongation des télomères) et de l'antigène T du virus SV40 (entrée facilitée en mitose). Des populations clonales obtenues, le clone D3 présentait les meilleures propriétés : morphologie, croissance, inhibition de contact, jonction serrées et expression stable de différents marqueurs moléculaires associés à un endothélium cérébral. D'où le nom de lignée hCMEC/D3.

Ces cellules conservent leur phénotype endothélial cérébral, sans signe de sénescence jusqu'à 100 doublements (35 passages) et expriment les marqueurs moléculaires spécifiques de la BHE avec la localisation souhaitée. En condition inflammatoire, elles expriment les facteurs d'adhérence leucocytaire (ICAM-1, VCAM-1, et MHC-II), ainsi que des récepteurs de chemokines (CXCR-1 à -5 et CCR-3 à -6). Ces cellules cultivées à confluence établissent les jonctions serrées spécifiques de la BHE, ce qui restreint le passage paracellulaire avec la même efficacité qu'*in vivo*.

7.7.2. Utilisation

Une recherche bibliographique sur pubmed (NCBI) avec le mot clef hCMEC/D3 renvoie à 97 résultats de 2013 à 2005 [pour revue Weksler *et al.*, 2013]. La lignée hCMEC/D3 est fréquemment utilisée comme modèle *in vitro* pour des études sur la physiologie, le métabolisme, l'immunologie, et la pharmacologie associée à la BHE [eg. Cucullo *et al.*, 2008 ; Hatherell *et al.*, 2011]. Elles sont également utilisées comme modèle d'étude du franchissement de la BHE par certains pathogènes : eg. *Cryptococcus neoformans* [Sabiiti et May, 2012], *Plasmodium falciparum* [Jambou *et al.*, 2010) et HIV-1 [Huang *et al.*, 2008].

7.8. Franchissement de la BHE par les agents pathogènes

De nombreux agents pathogènes ont été décrits pour franchir ou affecter la BHE, bactéries, champignons ou agents parasitaires – *Escherichia coli*, *Streptococcus B*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Trypanosoma*, *Treponema pallidum*, *Cryptococcus neoformans*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi*, Toxoplasmes – [Combes *et al.*, 2012 ; Bencurova *et al.*, 2011]. Différents virus peuvent affecter l'intégrité de la BHE : HSV-1, HIV-1, HTLV-1, virus de l'encéphalite japonaise, LCMV, virus de la Rage, SIV, virus de Theiler, virus de la Rougeole, virus West Nile [Combes *et al.*, 2012 ; Spindler et Hsu, 2012]. Les altérations de la BHE sont liées au franchissement (HIV-1, HTLV-1, virus West Nile, virus Rougeole) ou aux atteintes occasionnées par l'infection cérébrale (virus de la Rage, HSV). Elles sont causées par l'activation de MMP, l'altération de l'expression des protéines de jonctions serrées, la destruction des cellules ou la réponse immunitaire.

7.8.1. Processus viraux du franchissement de la BHE

7.8.1.1. Franchissement par transcytose

Ce processus a été montré pour le virus West Nile, qui peut franchir *in vitro* l'endothélium cérébral, sans en affecter l'intégrité, en utilisant un transport transmembranaire associé aux radeaux lipidiques (figure 27) [Hasebe *et al.*, 2010].

7.8.1.2. Mécanisme du cheval de Troie

Typiquement associé au virus HIV-1 et aux virus leucotropes, ce processus repose sur l'infection d'un ou plusieurs types de leucocytes qui sont amenés à franchir la BHE. L'atteinte cérébrale par le HIV-1 débute dès les premiers stades de la virémie. Au sein du SNC, les cibles primaires du HIV-1 sont les cellules immunitaires résidentes : macrophages et microglie. La réponse immunitaire cérébrale permet une élimination du virus. Mais cet état d'alerte de la BHE et du SNC, *via* la sécrétion de cytokines et de facteurs chemoattractants, va entraîner un afflux de leucocytes (certains infectés), qui vont entretenir l'infection (figure 27) [Persidsky et Poluektova, 2006 ; Yadav et Collman, 2009].

7.8.1.3. Infection de l'endothélium microvasculaire cérébral

Les virus peuvent franchir la BHE, en infectant les cellules de l'unité neurovasculaire. Des études *in vitro* montrent que différents virus neurotropes utilisent ce processus : virus West Nile

[Verma *et al.*, 2009], HTLV-1 [Afonso *et al.*, 2008], HIV-1 [Liu *et al.*, 2002]. Le virus de la Rougeole présente un mélange de traits : cheval de Troie et infection. Des lymphocytes T infectés par le virus de la rougeole présentent une forte expression d'intégrines (LFA-1 et VLA-4), ce qui se traduit par une adhérence trop forte à la surface des cellules endothéliales. Les lymphocytes infectés sont incapables de migrer à travers la barrière endothéliale, mais permettent au virus de la rougeole d'infecter les cellules endothéliales plus efficacement, *via* des contacts directs entre cellules (**figure 27**) [Dittmar *et al.*, 2008].

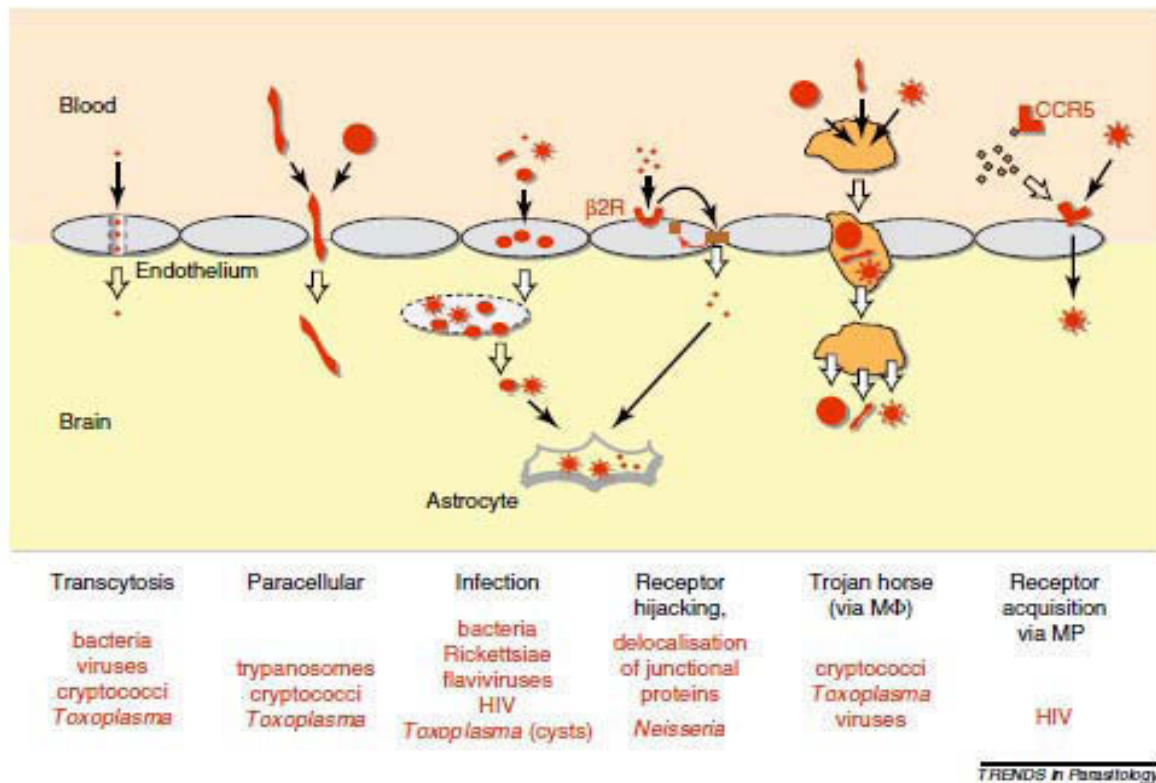


FIGURE 27. Différentes stratégies de franchissement de la barrière hémato encéphalique par des agents pathogènes.

Le récepteur adrénergique b2 (B2r) et le récepteur de chemokine CCR5, sont donnés à titre d'exemples, plusieurs autres récepteurs sont connus pour servir à l'invasion du système nerveux central (SNC). Abréviations: MΦ, monocytes-macrophages, MP, microparticules. (D'après Combes *et al.*, 2012)

7.8.2. Hypothèse d'un franchissement de la BHE par les EVs

Depuis l'étude princeps de Yang *et al.*, 1997 (voir § 6.5.2.) très peu de travaux et avec peu de génotypes, ont été réalisés pour valider l'hypothèse du franchissement de la BHE par les EVs. Un modèle *in vitro* d'endothélium humain microvasculaire cérébral établi avec la lignée HBMEC [Stins *et al.*, 2001] peut être infecté par le PV-1 et le CV-B3 [Bozym *et al.*, 2010 ; Coyne *et al.*, 2007 ; 2011]. Ces études montrent que le récepteur PVR est nécessaire pour que les cellules HBMEC soient infectées par le PV-1, de même avec le récepteur CAR et le co-récepteur DAF pour

le CV-B3. La fixation des virus à leurs récepteurs provoque une cascade de signalisations intracellulaire permettant leur internalisation. La fixation du CV-B3 induit une signalisation et une internalisation similaire à celle initiée lors de l'infection de cellules endothéliales primaires aortiques, mais elle est différente de celle induite lors de l'infection de cellules épithéliales Caco-2 (voir § 3.1.2.) [Bozym *et al.*, 2010]. Ces résultats indiquent une pluralité de mécanismes d'infection par ce virus en fonction du type cellulaire, mais aussi une conservation des mécanismes infectieux au sein des cellules endothéliales de différents tissus. Cette conservation permettrait à un même génotype EV d'atteindre différents tissus cibles *via* une infection depuis le sang de la barrière endothéliale limitrophe.

7.9. Le tropisme des entérovirus pour les tissus endothéliaux

Comme pour le SNC, les cellules parenchymateuses des tissus sont rarement en contact direct avec la circulation sanguine. Ceci implique que l'infection de ces tissus par les EVs circulants résulterait au préalable d'un contournement ou d'une infection des barrières endothéliales tapissant les vaisseaux afférents. Paradoxalement, il existe peu d'études *in vitro* sur un tropisme global des EVs pour les tissus endothéliaux et son implication dans l'atteinte parenchymateuse sous-jacente.

7.9.1. Cellules endothéliales vasculaires de cœur, de poumon, de foie

En 1990, une étude réalisée par Huber *et al* a montré que l'infection de tissus endothéliaux spécifiques chez la souris permettait une sélection du tropisme du CV-B3. La souche de référence du CV-B3 (Nancy) était inoculée par voie intra péritonéale à une souris DBA/2 adulte. Après 7 jours, la souris était sacrifiée et des suspensions virales étaient obtenues séparément du cœur, du foie et du poumon. Puis ces différents isolats étaient mis en contact avec des cultures de cellules endothéliales vasculaires de cœur, de foie et de poumon isolées de souriceaux nouveaux nés BALB/c ; ou bien inoculés à des souriceaux par injection intra péritonéale. Les résultats ont montré que la sensibilité des cellules endothéliales des différents tissus était liée au tissu qui avait servi à isoler le virus. Par exemple, les cellules endothéliales du cœur présentaient une plus forte sensibilité aux virus isolés du cœur, par rapport à ceux isolés du foie ou du poumon. Par extension, les souris inoculées par ces mêmes isolats cardiaques de CV-B3 présentaient un score de myocardite plus élevée. Ces travaux suggèrent que la souche virale constitue un facteur déterminant du tropisme viral, mais aussi que l'infection de cellules endothéliales spécifiques d'un tissu permet d'orienter le tropisme et la pathogénèse associée [Huber *et al.*, 1990].

7.9.2. Cellules endothéliales humaines primaires de la veine du cordon ombilical (HUVEC)

Les cellules primaires HUVEC sont le principal modèle utilisé dans l'étude du tropisme des EVs pour les cellules endothéliales. En 1980, une étude a montré leur sensibilité au PV-1 [Mac Gregor *et al.*, 1980]. Par la suite, le spectre de sensibilité des cellules HUVEC a été étendu à d'autres génotypes : E-9, E-12 et CV-B3 [Kirkpatrick *et al.*, 1984] ; CV-B1 à 6, CV-A9, CV-A13, echovirus types 1, 6, 7, 11, 25, 30 et 32 [Conaldi *et al.*, 1997 ; Saijets *et al.*, 2003 ; Ylipaasto *et al.*, 2010] ; EV-D94, D70 et D68 [Smura *et al.*, 2010]. L'infection des cellules HUVEC par les EVs provoque une expression membranaire accrue des protéines de recrutement des leucocytes (E-Selectine et ICAM-I) et une plus forte adhérence des granulocytes à la surface des tapis endothéliaux infectés. Ces études de sensibilité montrent également des différences infectieuses entre génotypes. Les infections par les CV-B1 à 6 ne sont pas associées à un ECP notable [Conaldi *et al.*, 1997 ; Saijets *et al.*, 2003], elles peuvent persister au moins 3 mois, affectent 4 à 6% des cellules lors de la phase aiguë, et seulement 1 à 2% pendant la phase persistante [Conaldi *et al.*, 1997].

7.9.3. Lignées immortalisées de cellules endothéliales humaines microvasculaires de derme (HDMEC)

Les cellules HDMEC présentent une sensibilité pour les CV-B3, 4 et 5, et l'EV-A71 [Zanone *et al.*, 2003 ; Liang *et al.*, 2004]. Comme pour les cellules HUVEC, les infections associées aux CV-B se traduisent par une absence d'ECP et un caractère persistant [Zanone *et al.*, 2003]. Les cellules infectées présentent également une expression membranaire accrue des protéines de recrutement leucocytaires ICAM-I et VCAM-I, une plus forte adhérence des granulocytes et une sécrétion de cytokines pro inflammatoires IL-6, IL-8, TNF α , et de facteurs chemo attractants.

7.9.4. Cellules endothéliales primaires humaines aortiques (HAEC)

Une étude a montré que le CV-B3 peut infecter des cellules endothéliales primaires humaines aortiques d'une manière similaire à des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales HBMEC [Bozym *et al.*, 2010].

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Etat des lieux de la bibliographie

Les entérovirus humains se caractérisent par leur résistance dans l'environnement liée à l'absence d'enveloppe et par leur grande variabilité génétique. Ils se transmettent par voie fécale-orale et respiratoire (contacts avec des personnes, objets ou aérosols contaminés) au sein de communautés denses et/ou fermées (crèche, écoles, maison). Les manifestations cliniques les plus graves mais rares sont la conséquence d'infections cérébrales (par exemple paralysie flasque, encéphalite). L'expression clinique la plus fréquente réalise le tableau d'une méningite aiguë spontanément résolutive. Il n'existe ni traitement spécifique ni vaccin, hormis la vaccination anti poliomyélitique protégeant contre les trois types de poliovirus. Les processus pathogéniques des infections à EV sont complexes car ces virus se multiplient dans de nombreux sites (oropharynx, épithélium de l'intestin grêle et tissus lymphoïdes associés) et le rôle de la virémie dans la dissémination chez un même individu est mal connu. Les événements conduisant à l'entrée des EVs dans le système nerveux central, l'importance de la charge virale dans le liquide céphalorachidien (LCR) et sa corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel restent mal explorés.

PLAN EXPERIMENTAL

Etude de la charge virale EV chez les patients présentant une méningite

Dans une première approche *in vivo* de la pathogénie des méningites à EV, nous avons réalisé l'étude prospective de la charge virale dans le LCR et du génotype viral pendant la phase aiguë de l'infection clinique pour les comparer aux paramètres cliniques et biologiques des patients de quatre populations : nouveau-né, nourrisson, enfant et adulte.

Pour réaliser ces travaux, nous avons d'abord validé une technique de RT-PCR quantitative (RT-qPCR) incluant un contrôle interne pour quantifier les EVs dans des prélèvements biologiques (sang, LCR) ou des surnageants de culture. Puis nous avons utilisé cette technique pour déterminer les charges virales dans le LCR. Les différents résultats cliniques, biologiques, et virologiques ont été analysés statistiquement.

Les résultats attendus étaient : (1) l'identification des paramètres biologiques et virologiques expliquant l'intensité de la charge virale retrouvée dans le LCR. (2) L'identification de facteurs de sévérité d'une infection neuro-méningée : âge des patients ou caractéristiques génétiques du virus.

Interaction des entérovirus avec un modèle cellulaire de barrière hémato encéphalique

La seconde partie des travaux était d'étudier le mode de franchissement de la barrière hémato encéphalique par les EVs. Bien que cette voie d'entrée des EVs dans le système nerveux central soit abondamment citée dans la littérature, les processus mis en jeu restent peu connus, notamment au regard de la diversité des EVs.

Pour modéliser *in vitro* la barrière hémato encéphalique, nous avons utilisé la lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (hCMEC/D3). Afin d'avoir un large aperçu de la perméabilité des cellules par rapport à la diversité des EVs, nous avons opté pour une stratégie de criblage d'un grand nombre de souches sélectionnées selon des caractéristiques phylogénétiques et représentant différents génotypes. L'aspect innovant de cette recherche est la prise en compte des EVs dans toute leur diversité pour analyser le processus de franchissement de la barrière hémato encéphalique, dans la perspective de mieux cerner les atteintes cérébrales.

Les résultats attendus étaient : (1) La validation de la lignée cellulaire hCMEC/D3 comme modèle d'étude du franchissement de la barrière hémato encéphalique par un large éventail d'EVs. (2) L'identification de points communs et de divergences entre les EVs au sein d'un même système physiopathologique. (3) La sélection de souches virales représentatives de profils infectieux particuliers.

MATERIELS ET METHODES

On ne peut comprendre un processus en l'interrompant. La compréhension doit rejoindre le cheminement du processus et cheminer avec lui.

Dune (1965) Franck Herbert

Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires ont été incubées dans une étuve à 37°C, avec une atmosphère humide à 5% de CO₂.

- La lignée cellulaire endothéliale cérébrale microvasculaire humaine hCMEC/D3 [Weksler *et al.*, 2005] a été mise à la disposition du laboratoire sous licence de l'Inserm (Dr. P.O. Couraud, Paris). Les cellules hCMEC/D3 ont été cultivées dans le milieu de base EBM-2 (Lonza) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (PAA), 5% de sérum de veau fœtal (PAA), 1% de « Chemically Defined Lipid Concentrate » (Invitrogen), 10 mM d'HEPES (PAA), 1,4 µM d'hydrocortisone (Sigma Aldrich), 1,5 µg×ml⁻¹ d'acide ascorbique (Sigma Aldrich) et 200 ng×ml⁻¹ de « basal fibroblast growth factor » (Sigma Aldrich).
- La lignée cellulaire RD est issue d'un rhabdomyosarcome humain. Les cellules RD ont été cultivées dans du milieu de base QUANTUM 263 (PAA) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (PAA) et de sérum de veau fœtal (PAA), 4% pour les renouvellements de milieu et 10% pour les passages.
- La lignée cellulaire KB est dérivée de la lignée humaine HeLa. Les cellules KB ont été cultivées dans du milieu de base DMEM (PAA) supplémenté de : 1% de pénicilline-streptomycine (PAA) et 6% de sérum de veau fœtal (PAA).

Virus

Une collection de 88 souches d'EVs a été constituée, comprenant 23 souches prototypes et 65 souches isolées de prélèvements cliniques (LCR, gorge, selles) de patients hospitalisés au CHU de Clermont-Ferrand. Les suspensions stocks ont été préparées par culture virale avec les lignées cellulaires KB (génotypes CVB) et RD (autres génotypes). Les stocks viraux ont été titrés par la méthode des dilutions en point limite et ont été conservés à -20°C. Pour les expérimentations réalisées avec les cellules hCMEC/D3, chaque inoculum était préparé de façon à obtenir une multiplicité infectieuse (MOI) de 5 par dilution des suspensions virales stocks dans le milieu EBM-2 sans SVF. Après un double lavage avec du tampon PBS, les tapis cellulaires hCMEC/D3 étaient inoculés une heure à 37°C. Après avoir éliminé l'inoculum, les tapis cellulaires étaient lavés 2 fois avec du tampon PBS, puis incubés pendant différentes périodes dans du milieu complet EBM-2.

Etude prospective de la charge virale et du type EV chez les patients

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique des Centres d'Investigation Clinique de l'Inter-Région Rhône-Alpes-Auvergne (IRB 5044). Un total de 156 patients avec une méningite à EV (recherche du génome viral dans le LCR) a été inclus dans l'étude. Ils ont été hospitalisés au

CHU de Clermont-Ferrand entre 2008 et 2012 (n = 133) et dans l'Unité de pédiatrie du centre hospitalier de Versailles entre juin et août 2011 (n = 23). La population recrutée comprenait 19 (12%) nouveau-nés (de 9 - 28 jours, âge médian 21 jours;), 27 (17%) nourrissons (de 30 à 458 jours, âge médian 40 jours), 57 (37%) enfants (de 2 à 15 ans, âge médian 6 ans), et 53 (34%) adultes (de 17 à 57 ans, âge médian 31 ans). Aucun patient ne présentait d'immuno dépression. Les recherches bactériologiques et la détection moléculaire d'herpesvirus simplex étaient négatives pour tous les patients. Le diagnostic moléculaire des EVs dans le LCR était réalisé, à Clermont-Ferrand, à l'aide du kit NucliSENS EasyQ^R Enterovirus de bioMérieux, et avec le test SmartCycler[®] EV de Cepheid's Xpert[®] à Versailles. Tous les échantillons de LCR positifs pour un EV ou leurs extraits ARN ont été conservés à -80°C et analysés dans les 8 jours pour déterminer la charge virale.

La souche d'EV a été typée selon une technique déjà décrite [Mirand *et al.*, 2008]. Le génotypage (séquençage du gène 1D codant la protéine de capsid VP1) a été réalisé avec les extraits ARN des prélèvements de LCR, ou bien d'extraits ARN de prélèvements de sang ou de gorge associés.

Les résultats prospectifs de quantification et de génotypage ont été exploités conjointement avec (1) les données cliniques du patient, extraites de son dossier d'hospitalisation obtenu auprès des différents services hospitaliers et (2) les données biologiques du prélèvement de LCR, extraites du dossier informatique du serveur des laboratoires du CHU de Clermont-Ferrand. Les paramètres incluaient : l'historique clinique du patient, la date d'hospitalisation, les paramètres cytologiques et biochimiques du LCR, et l'intervalle de temps entre l'apparition des premiers symptômes et la réalisation de la ponction lombaire. En l'absence de données précises concernant l'heure d'apparition des premiers symptômes, les temps 08h00, 14h00, 20h00 et 02h00 ont été fixés arbitrairement pour définir respectivement le matin, l'après-midi, le soir et la nuit. Une pléiocytose dans le LCR a été définie comme un nombre de leucocytes >19 cellules/mm³ chez les patients dont l'âge était ≤ 28 jours, et comme un nombre de leucocytes ≥10 cellules/mm³ pour les patients plus âgés [Kestenbaum *et al.*, 2010]. La concentration protéique dans le LCR était considérée comme normale si elle était ≤ 0,9g/l pour les patients dont l'âge était < 30 jour et ≤ 0,45g/l pour les autres.

Amorces et sondes

Les sondes fluorogéniques TaqMan et les amorces ont été synthétisées par Sigma Aldrich. Les amorces EV1 et EV2, et les sondes TaqMan EVPb et ICPb ont été utilisées pour l'amplification par RT-PCR multiplex en temps réel des EVs et du contrôle interne compétitif.

RT-PCR quantitative en temps réel des génomes EVs

Les acides nucléiques EV ont été extraits de suspensions virales et de prélèvements de LCR (200 µl) à l'aide de l'automate NucliSens®easyMAG™ system (bioMérieux), selon les instructions du fournisseur. Les ARNs purifiés étaient élués dans 25 µl d'eau qualité biologie moléculaire et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Un contrôle interne compétitif « maison » (CIC) était ajouté à chaque échantillon (10 µl, 200 copies/µl) lors de chaque extraction pour évaluer la qualité des étapes d'extraction et d'amplification génique.

La RT-qPCR en temps réel a été réalisée dans un volume final de 20 µl pour chaque test. Cinq µl d'extrait ARN (incluant l'IC) étaient ajoutés à 15 µl d'un tampon réactionnel préparé à l'aide de la trousse LightCycler®RNA Master HybProbe kit (Roche). Le mélange réactionnel contenait 3,25 mM de Mn(OAc)₂ ; 700 nM de chaque amorce EV1 et EV2 ; 200 nM de chaque sonde Taqman EVPb et ICPb ; et la solution LC®RNA Master HybProbe (concentration finale 1X). Le volume final était ajusté avec de l'eau. Les réactions de transcription inverse et d'amplification ont été réalisées avec un thermocycleur Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen) en utilisant les conditions suivantes : 20 minutes à 61°C pour la transcription inverse, 2 minutes à 95°C pour l'activation de l'ADN polymérase, et 45 cycles comprenant une étape de dénaturation de 5 secondes à 95°C et une étape d'hybridation/élongation de 60 secondes à 60°C. A la fin de chaque étape d'élongation, l'intensité de la fluorescence est mesurée par l'automate.

Etude du franchissement d'un modèle *in vitro* de BHE par les EVs

Un modèle *in vitro* de barrière endothéliale a été constitué en cultivant les cellules hCMEC/D3 sur des membranes microporeuses (diamètre des pores, 0.4 µm) enduites de collagène-I et montées sur inserts Transwell® 12 puits (Corning). Après avoirensemencé environ 45.000 cellules dans les inserts, les cultures étaient incubées dans les conditions décrites ci-dessus ; le milieu était changé au bout de 3 jours. La perméabilité paracellulaire de la monocouche confluente a été déterminée avec la technique décrite ci-dessous entre 5 et 7 jours après ensemencement. Lorsque l'étanchéité requise était atteinte (5 à 7 jours post ensemencement), les monocouches étaient inoculées par la face luminale avec des souches différentes d'EVs. Les surnageants de culture ont été prélevés séparément dans les compartiments luminaux et abluminaux à différents temps après l'inoculation. Pour chaque temps, l'étanchéité paracellulaire de la monocouche a été contrôlée, les cellules et les puits ont été lavés, et le milieu de culture a été renouvelé. Le nombre de particules virales infectieuses et de génomes viraux dans les compartiments abluminaux ont été respectivement déterminés par titrage en dilution limite et RT-qPCR.

Mesure de l'étanchéité paracellulaire du modèle *in vitro* de BHE

L'étanchéité paracellulaire du modèle *in vitro* de BHE a été déterminée en triplicat par la mesure du coefficient de perméabilité du fluorophore Lucifer Yellow (LY, Sigma Aldrich). Les cellules hCMEC/D3 cultivées sur insert Transwell ont été lavées avec du tampon HBSS (PAA) supplémenté avec 1% d'HEPES (PAA) à 10 mM (PAA) et 1% de pyruvate de sodium 1 mM (PAA). Une solution du fluorophore LY (50 μ M) a été introduite dans le compartiment luminal de l'insert. Puis l'insert a été successivement incubé à 37°C pendant 10, 15 et 20 min dans 3 puits différents contenant du tampon HBSS supplémenté (compartiment abluminal). La quantité de fluorophore ayant filtré par voie paracellulaire à travers l'insert a été déterminée dans chacun des compartiments abluminaux ; la quantité résiduelle dans la solution de LY présente dans le compartiment luminal du dernier test (45 min) a aussi été déterminée. Des membranes enduites de collagène sans cellules ont été utilisées comme témoins négatifs. Tous les échantillons collectés ont été analysés dans des plaques 96 puits de surface noire à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan, Thermo Scientific) pour mesurer la fluorescence émise (excitation 425 nm, émission 538 nm) et déterminer le coefficient de perméabilité par unité de temps et de surface.

Tests de viabilité des cellules hCMEC/D3

Les cellules hCMEC/D3 cultivées sur des plaques 12 puits enduites de collagène ont été inoculées avec différentes souches d'EV ($n = 15$), puis cultivées pendant 24 h à 37°C. Les monocouches cellulaires ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS sans Ca^{2+} and Mg^{2+} , puis détachées par une solution enzymatique ($\frac{3}{4}$ Accutase (PAA) et $\frac{1}{4}$ trypsine/versène (Eurobio)) pendant 5 min à 37°C. La solution enzymatique était ensuite neutralisée par l'ajout de milieu EBM-2 complet. Les cellules détachées ont été collectées et centrifugées pendant 10 minutes à 1000g. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du kit « Apoptosis necrosis healthy cells » (Promokine), selon les instructions fournies. Ce kit cible le marqueur d'apoptose annexine V à l'aide d'un anticorps conjugué avec le fluorophore FITC, et les cellules perméabilisées à l'aide d'un colorant d'exclusion, éthidium homodimer III. Après marquage, les cellules ont été lavées dans le tampon salin fourni avec le kit, et les différentes populations cellulaires ont été dénombrées par cytométrie en flux, BD LSRII instrument (BD Bioscience). Nous avons considéré qu'une cellule était en apoptose grâce au marquage par l'annexine V ou en nécrose grâce au double marquage par l'annexine V et l'éthidium homodimer III. Un marquage simple à l'éthidium homodimer III indiquait un débris cellulaire. Quatre tests de viabilité indépendants ont été réalisés avec environ 30.000 cellules comptées pour chaque test.

Microscopie à fluorescence

Les cellules hCMEC/D3 cultivées sur des lames de culture en verre 8 puits enduites de collagène ont été exposées à 50 souches différentes d'EV, puis à nouveau incubées à 37°C pendant 6 heures. Les monocouches cellulaires ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS, puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, 5 minutes à température ambiante. Le marquage des mitochondries actives était réalisé 1 heure avant la fixation, par l'incubation des cellules avec du milieu EBM-2 complet supplémenté avec 50 nM de MitoTracker® Mitochondrion-Selective probe M7510 (Invitrogen). Les cellules fixées et lavées avec du tampon PBS ont été perméabilisées à l'aide d'une solution contenant 0,5% Triton X100 pendant 10 minutes à température ambiante, puis les sites aspécifiques ont été saturés par incubation dans un tampon PBS avec 5% de BSA pendant 10 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées une nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaires monoclonaux de souris, dirigés contre la protéine de capsid VP1 des EVs (Diagnostic Hybrid). Après 3 lavages extensifs avec du tampon PBS, les cellules ont été incubées pendant une heure à 37°C dans une solution d'un anticorps secondaire anti-souris conjugué au fluorophore DyeLight 488 (Anticorpsenligne). Pour les cellules dont les mitochondries n'étaient pas préalablement marquées, la solution d'anticorps secondaire a été supplémentée de phalloïdine-Red (généreusement fournie par le Pr. Arlette Darfeuille-Michaud, Uda) pour réaliser un contre marquage des filaments d'actine. Après 3 lavages extensifs avec du tampon PBS, l'ADN nucléaire a été contremarqué avec une solution de Hoechst, pendant 5 minutes à température ambiante. Puis les préparations ont été montées entre lame et lamelle avec une solution glycérine/PBS (v/v). Les préparations ont été observées avec un microscope à épifluorescence Olympus BX41 et avec un microscope confocal LSM510 CarlZeiss MicroImaging Inc, équipé des lasers Argon (488 nm), HeNe568 (568nm) et HeNe633 (633nm).

Microscopie Electronique

Les cellules hCMEC/D3 cultivées sur insert ont été lavées dans un tampon 0,2 M Na cacodylate (pH = 7,4) et fixées une nuit à 4°C dans un tampon 0,2 M Na cacodylate contenant 1,6 % glutaraldehyde. Les échantillons ont ensuite été lavés 3 fois dans un tampon 0,2 M Na cacodylate (pH = 7,4). Une fixation a été réalisée dans du tampon 1% OsO₄ - 0,2 M Na cacodylate (pH = 7,4) pendant 1 heure, puis les échantillons ont été lavés 3 fois dans un tampon 0,2 M Na cacodylate (pH = 7,4).

- Pour la microscopie électronique à **balayage**, les échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol en gradient croissant. Le point critique de déshydratation des échantillons a été atteint avec 2 traitements (10 min) par une solution de 100% éthanol et

hexaméthylidisilane (1:1). Enfin les échantillons ont été métallisés avec de l'or à l'aide du métalliseur JFC-1300 (JEOL), et observés à 5 kV avec un microscope électronique à balayage JEOL 6060-LV.

- Pour la microscopie électronique à **transmission**, les échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol en gradient croissant. Puis ils ont été traités successivement avec des préparations de résine EPON dans de l'éthanol à raison de (1 : 2), (1 : 1), et (2 : 1) pendant 1 heure pour chaque traitement. Les échantillons ont été ensuite inclus dans la résine pendant une nuit à température ambiante, puis la résine a été polymérisée pendant 2 jours dans un incubateur à 60°C. Des coupes ultra fines (70 nm) de l'échantillon ont été réalisées à l'aide de l'ultra microtome UC6 (Leica), puis elles ont subi un traitement par une coloration contrastante d'acétate d'uranyle et de citrate de Pb. Le carbone a été évaporé avec l'évaporateur CE6500. Les coupes d'échantillons ont ensuite été observées à 80 kV avec un microscope électronique à transmission Hitachi H-7650.

Toutes les préparations d'échantillons de microscopie électronique ont été réalisées au Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France). Tous les réactifs chimiques utilisés étaient fournis par Electron Microscopy Science (Delta Microscopies).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Stata, version 12 (StataCorp, College Station, TX, USA). Les tests étaient bilatéraux, avec une erreur de type I fixée à $\alpha = 0,05$.

Analyses statistiques de la charge virale dans le LCR en relation avec les paramètres cliniques, biologiques et virologiques.

Les caractéristiques des patients ont été présentées comme la moyenne \pm écart-type (SD) ou la médiane (intervalle interquartile, IR) pour chaque groupe d'âge pour les données continues, et comme le nombre de patients ou les pourcentages associés pour les données catégorielles. Les charges virales en copies de génome par ml ont été converties en log de base 10 pour ces analyses.

Pour les variables catégorielles, les comparaisons entre les groupes ont été analysées avec le test du chi-2 ou le test exact de Fisher suivies par une procédure de Marascuilo, et test ANOVA. Pour les variables quantitatives, les comparaisons entre les groupes ont été analysées avec le test de Kruskal-Wallis (normalité vérifiée par le test de Shapiro-Wilk et l'homoscédasticité par le test de Bartlett), suivie par un test de comparaisons multiples post-hoc approprié (Tukey-Kramer ou Dunn). Les relations entre les paramètres quantitatifs ont été explorées par des coefficients de corrélation

(Pearson ou Spearman). Un modèle de régression linéaire (avec des charges virales EV variables dépendantes) a été examiné dans la situation multivariée (backward & forward stepwise) pour les facteurs jugés importants en analyse univariée ($P < 0,1$) et en fonction de paramètres biologiques et cliniques pertinents, tel que le nombre de globules rouges, le niveau de protéine dans le LCR et la durée des symptômes. Les interactions entre les différents facteurs ont été testées. Les résultats ont été exprimés sous forme de coefficients de régression et d'intervalle de confiance de 95% (CI).

Pour étudier les biais éventuels causés par une ponction lombaire traumatique, nous avons également ajusté les formules leucocytaires et les concentrations protéiques en soustrayant un globule blanc tout les 500 à 1000 globules rouges dans le LCR, et 0,01 g / l de protéines tout les 1000 globules rouges / mm³. Les résultats obtenus avec les deux méthodes étaient comparables.

Analyses statistiques des résultats de l'infection et du franchissement du modèle in vitro de barrière endothéliale cérébrale

Les données quantitatives sont exprimées en moyennes (\pm écart type). La distribution gaussienne des données quantitatives a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Les données corrélées ont été analysées par des modèles mixtes pour étudier l'évolution des paramètres en tenant compte de la variabilité entre et au sein des souches. La normalité de tous les modèles a été étudiée. Ces analyses ont été complétées (pour les mesures répétées) par l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par un test post-hoc de Tukey-Kramer. L'analyse multidimensionnelle (analyse en composantes principale dans notre cas) a été menée pour explorer la relation entre plusieurs paramètres quantitatifs. Enfin, pour quantifier ces relations, les coefficients de corrélation (Pearson ou Spearman, le cas échéant) ont été calculés.

TRAVAUX ORIGINAUX

L'espérance ternit l'observation

Dune (1965) Franck Herbert

Développement d'une méthode moléculaire d'analyse et de détection des entérovirus

Les EVs humains représentent la principale cause de méningite aiguë et sont impliqués dans d'autres pathologies cérébrales. La pathogenèse de ces infections reste cependant peu comprise et les recherches dans ce domaine bénéficieraient de disposer d'une technique quantitative pour étudier la charge virale *in vivo*. Cette première étude décrit le développement d'une technique de RT-PCR quantitative destinée à déterminer la charge virale EV aussi bien dans des prélèvements d'origine clinique que d'autres échantillons comme des surnageants de culture. La technique est basée sur une RT-PCR en temps réel utilisant des sondes d'hydrolyse TaqMan® et un couple d'amorce précédemment décrit [Archimbaud *et al.*, 2004] ciblant la séquence 5'NC hautement conservée du génome des entérovirus humains. L'amplification est réalisée sur Rotorgene™6000 (Qiagen) à l'aide du kit d'amplification LC®RNA Master HybProbe (ROCHE), pour un volume final de 20 µl, dont 5 µl d'échantillon.

L'optimisation de différents paramètres (température d'hybridation et concentration en amorces, en sonde et en réactifs) a été réalisée en testant l'efficacité de l'amplification génique de plusieurs points d'une gamme du virus E-25 ($1,3 \times 10^5$ à 1,3 TCID₅₀). Les concentrations optimales des amorces et de la sonde EV sont respectivement de 700 nM et 200 nM. Les conditions d'amplification sont : une étape de transcription inverse de 20 min à 61°C, une étape d'activation de la Hot Start Taq polymérase de 5 min à 95°C, suivie de 45 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 5 s à 95°C et une étape d'hybridation/amplification de 1 min à 60°C. Les niveaux de fluorescence sont mesurés à la fin de chaque cycle.

La sensibilité et la reproductibilité inter et intra essai de la technique ont été déterminées en quadruplicat à l'aide d'une gamme étalon de raison 10 d'un standard quantitatif ARN de la séquence 5'NC des EVs (600.000 à 0,6 copies/µl) et de la gamme d'E-25 ($1,3 \times 10^5$ à 1,3 TCID₅₀) (**Publication n°1, Figure 1 et 2**). Le standard ARN 5'NC a été obtenu par transcription *in vitro* d'un fragment cloné du génome de l'E-30 Bastianni. Les reproductibilités inter et intra essais de la technique ont été respectivement testées et validées en 4 et 5 répliques des gammes d'E-25 et de standard ARN 5'NC (**Publication n°1, Table 2**). Les coefficients de variation intra essai étaient de 0,64 à 1,63%. Les coefficients de variation inter essai étaient de 0,92 à 7,76%. Une détection limite a été obtenue pour une concentration d'ARN de 6 copies par µl. La détection limite reproductible

(100%) a été obtenue à l'aide d'une gamme de raison 2 du standard ARN (60 à 7,5 copies/ μ l) pour une concentration de 15 copies par μ l (soit 1875 copies par ml, selon le protocole d'extraction).

La spécificité de la technique a été validée par l'amplification positive de plus de 44 génotypes différents et l'absence d'amplification pour des virus autre que les entérovirus : parechovirus-1, -2 et -3 et des virus représentant les 3 espèces de rhinovirus, y compris à forte concentration. De même les autres virus pouvant être fréquemment retrouvés dans des prélèvements cérébrospinaux : *Adenoviridae* et *Herpesviridae* ne sont pas reconnus.

Un contrôle interne compétitif (CIC) a été synthétisé selon une stratégie inspirée des travaux de Naze *et al.*, 2009. Une séquence cible a été choisie dans le plasmide pBR322 selon les critères suivants : (1) absence d'appariements avec les génomes EV et (2) GC% similaire aux cibles EVs. Le CIC a aussi été conçu pour que son amplicon ait une taille légèrement supérieure à celle des amplicons EV (197 vs 145 pb) afin de pouvoir le distinguer si besoin par électrophorèse en gel d'agarose. La séquence cible pBR322 a été amplifiée à l'aide de 2 amorces dont l'extrémité 5' sortante contenait les sites d'hybridation aux amorces EVs (caractère compétitif du CIC) et des sites de restriction. L'ADN composite obtenu a ensuite été cloné, validé par séquençage, transcrit *in vitro*. Une sonde TaqMan spécifique du CIC a été élaborée.

La quantité optimale du CIC à inclure aux prélèvements dès l'étape d'extraction des acides nucléiques a été déterminée en réalisant une gamme étalon de raison 10 (200.000 à 2 copies/ μ l). Pour chaque point de la gamme CIC, 10 μ l de solution d'ARN CIC ont été ajoutés à 200 μ l de LCR (détection d'EV négative), puis l'ensemble a été extrait avec l'automate EasyMag (bioMérieux). Une amplification génique a été effectuée pour les différents éluas d'acides nucléiques en utilisant les conditions décrites ci-dessus. La limite de détection du CIC été établie à 200 copies par prélèvement mais nous avons opté pour la quantité de 2000 copies de CIC par prélèvement (soient 10 μ l à 200 copies/ μ l). L'absence de compétition délétère entre le CIC et l'ARN EV a été vérifiée en quadruplat par la comparaison des cycles seuils (Ct) obtenus lors de l'amplification multiplex de la gamme d'E-25 extraite avec ou sans CIC (10 μ l à 200 copies/ μ l). A cette concentration, le CIC ne diminue pas la sensibilité de la technique (**Publication n°1, Figure 2 et Table 2**) et il est correctement détecté en 5 réplicats à un Ct constant d'environ 30 cycles, variation de 2,15% (**Publication n°1, Figure 3**).

ARTICLE

Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in central nervous system

Romain Volle^{a b c}, Céline Nourrisson^b, Audrey Mirand^{a b c}, Christel Regagnon^{b c}, Martine Chambon^{a b c}, Cécile Henquell^{b c}, Jean-Luc Bailly^{a c}, Hélène Peigue-Lafeuille^{a b c}, and Christine Archimbaud^{a b c *}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, EA3843, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

^c Centre National de Référence des *Enterovirus et Parechovirus*, laboratoire associé : CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

Journal of Virological Methods 185 (2012) 142-148.

VOIR ANNEXES

Commentaires des travaux

Une technique de RT-PCR en temps réel pour l'amplification conjointe du génome des EVs en présence d'un contrôle interne compétitif a été développée avec succès. Elle est basée sur l'amplification multiplex de ces deux matrices ARN dans un même tube au cours d'une même réaction d'amplification. Ce système présente l'avantage de limiter le risque de contamination croisée et réduit la variation du rendement de la RT-PCR d'un tube à un autre. Le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification est réalisé au moyen de sondes fluorimétriques utilisant la technologie TaqMan.

La détection du génome viral est réalisée à l'aide d'un couple d'amorces précédemment décrit par notre laboratoire [Archimbaud *et al.*, 2004], qui cible la séquence 5' non codante très conservée parmi les génomes EV. Les séquences des amorces et de la sonde TaqMan ont été établies avec un alignement de 488 séquences de régions 5'NC correspondant à 88 génotypes différents parmi les 4 espèces d'entérovirus retrouvés chez l'homme. A un ou deux nucléotides mésappariés pour quelques rares souches infra génotypiques, les sites choisis correspondent aux séquences les plus conservées au sein de l'alignement. Cette très haute conservation des sites d'hybridation limite au maximum un biais inter espèce ou intergénotype. Par ailleurs la taille d'amplicon ainsi que le GC% conservé entre les différents génotypes font de cette séquence le site le plus optimal pour synthétiser des standards d'ARN de concentrations calibrées. Notre choix s'est porté sur la région 5'NC de l'E-30 Bastianni, car ce virus représente un génotype communément retrouvé.

Réciproquement, nous avons vérifié la spécificité des amorces et des sondes pour les entérovirus humains historiques par une absence d'appariement avec des alignements de séquences des 3 espèces (A, B et C) de rhinovirus. L'absence d'amplification détectée pour des cibles autres que les entérovirus y compris à forte concentration et en présence de CIC, valide la spécificité de notre technique. Enfin, les performances de la technique quantitative ont été validées avec les Contrôles de Qualité Moléculaire Européens (EU-QCMD) de 2009 à 2013.

Le seuil de détection de la technique était de 6 copies par μ l et le seuil de quantification reproductible à 15 copies par μ l, soit 1875 copies/ml de LCR (volume d'éluât). La sensibilité de notre technique est équivalente à celles rapportées dans d'autres études : 3800 copies/ml de standards d'ARN de CV-B3 [Dierssen *et al.*, 2008] ou 3500 copies/ml de standards d'ARN de poliovirus type 1/Mahoney [Monpoeho *et al.*, 2002]. Les valeurs quantitatives déterminées pour les échantillons du contrôle de qualité européen entérovirus/parechovirus se situent dans la moyenne des valeurs rendues avec les techniques quantitatives d'autres participants.

A la différence de nombreuses autres techniques de quantification moléculaire, notre technique dispose d'un ARN contrôle interne compétitif (CIC). Ce CIC est inclus dès l'étape d'extraction des acides nucléiques à une concentration ajustée. L'amplification du CIC permet la détection d'inhibiteurs et valide la qualité des différentes étapes de l'analyse. Notre choix s'est porté sur la synthèse d'un contrôle interne compétitif, car il présente l'avantage d'avoir une efficacité d'amplification liée à celle de la cible EV dont il partage les amorces. Le CIC est utilisé à la plus faible concentration amplifiable, reproductible et non inhibitrice pour se placer dans les conditions optimales. Nous avons déterminé cette concentration à 200 copies/ μ l (2000 copies par extraction). Aucune compétition significative n'a été notée entre le CIC et une cible EV. Une limite cependant existe pour notre CIC sous sa forme actuelle. Comme c'est un ARN libre en solution, il est sensible et peut se dégrader à la suite de fréquents cycles de congélation décongélation. Notre expérience montre que ce risque reste limité à condition de respecter certaines règles de stockages. L'encapsulation du CIC permettrait de limiter davantage le risque tout en mimant une particule virale.

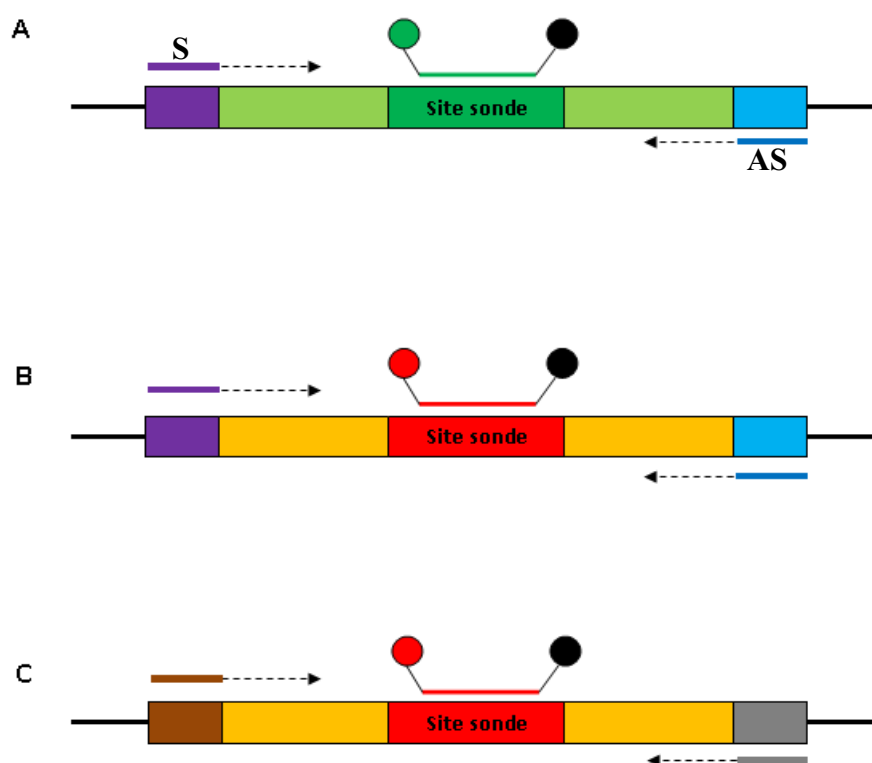


FIGURE 28. Principe d'amplification des contrôles internes *versus* la cible dans une PCR en temps réel basée sur des sondes d'hydrolyses (TaqMan™).

(A) Fragment génomique de la cible amplifiée par RT-PCR. (B) Fragment génomique d'un contrôle interne compétitif amplifié par RT-PCR, même couple d'amorces mais sonde différente de la cible. (C) Fragment génomique d'un contrôle interne non compétitif amplifié par RT-PCR, amorces et sonde différente de la cible.

Abréviations : S, amorce sens ; AS, amorce antisens. Légende : le rond noir représente le quencher non fluorescent de la sonde, les ronds rouges et verts représentent les fluorophore des sondes TaqMan.

Etude de la charge virale entérovirus chez les patients présentant une méningite

Dans un contexte clinique évocateur, le diagnostic de certitude d'une atteinte méningée ou cérébrale repose sur la détection qualitative générique du génome des EVs dans le LCR. L'identification précoce du génotype de l'EV impliqué dans l'infection est importante pour détecter les variants épidémiques et elle représente un outil indispensable dans la prise en charge des patients présentant une infection à EV-A71. La charge virale n'a pas été étudiée comparativement pour différents génotypes d'EVs malgré l'intérêt de mieux comprendre la physiopathologie des infections neuro-méningées causées par ces virus. Dans une première approche de la pathogénie des méningites à EV, nous avons initié la première étude prospective de la charge virale dans le LCR pendant la phase aiguë de l'infection clinique en utilisant la technique RT-qPCR développée auparavant. Cette étude stratifiée sur l'âge des patients (adultes, enfants, nourrissons, nouveau-nés) a été réalisée de manière continue sur une période de 5 ans.

Cette étude chez les patients hospitalisés présentant une méningite à EV a été approuvée par le Comité d'Ethique des Centres d'Investigation Clinique de l'Inter-Région Rhône-Alpes-Auvergne, France (IRB 5044). Nous avons analysé les LCR de 202 patients hospitalisés à l'hôpital universitaire de Clermont-Ferrand (n=179 ; 1^{er} janvier 2008 – 31 décembre 2012) et à l'Unité de pédiatrie de l'hôpital de Versailles (n=23 ; juin – août 2011). Au total 156 patients ont été inclus dans l'étude statistique ; 46 furent exclus parce que la charge virale était inférieure au seuil de quantification de la technique. Les souches d'EV ont été prospectivement génotypées par séquençage des gènes codant les protéines de capsid VP1 et/ou VP4/VP2 selon la technique décrite par **Mirand et al. [2008]**.

La population d'étude était la suivante : 19 (12%) nouveau-nés (âge médian de 21 jours; intervalle 9–28 jours), 27 (17%) nourrissons (40 jours; 30–458 jours), 57 (37%) enfants (6 ans ; 2–15 ans), et 53 (34%) des adultes (31 ans; 17–57 ans). Deux génotypes EV (E-30 et E-6) ont majoritairement infecté les adultes et les enfants au cours de 2 flambées épidémiques en 2009 et 2011. Les nourrissons et les nouveau-nés ont été infectés par une dizaine de génotypes différents d'incidence relativement similaires.

L'analyse statistique a comparé les charges virales EV avec des paramètres biologiques (nombre de leucocytes dans le LCR, protéinorachie), des paramètres cliniques (les symptômes, et l'intervalle de temps entre le début des symptômes et la ponction lombaire dans le LCR) et des

paramètres virologiques (génotype des EVs). Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- La charge virale était corrélée avec l'âge des patients, plus particulièrement elle est plus élevée chez les nouveau-nés par rapport aux nourrissons et aux enfants, mais pas par rapport aux adultes (**Publication n°2, Figure 1A**). Une charge virale plus importante était également corrélée à une pléiocytose et une protéinorachie plus élevées dans le LCR (**Publication n°2, Figure 1B**).
- L'absence de leucocytes dans le LCR était corrélée à une ponction lombaire réalisée très précocement après les premiers signes cliniques (fièvre) chez les nouveau-nés et les nourrissons (**Publication n°2, Figure 2**). Cependant, aucune relation ne fut trouvée entre la précocité de la ponction lombaire à l'admission et la charge virale.
- Aucune relation statistique n'a pu être établie entre la charge virale EV et la présence des symptômes méningées : fièvre, raideur de nuque et céphalées.
- La charge virale était corrélée au génotype d'EV. Ce point constitue l'aspect le plus original de cette étude. Les génotypes E-30 et CVB sont reliés à des charges virales plus élevées, par rapport aux génotypes E-6 et E-11 (**Publication n°2, Figure 3**). Une analyse phylogénétique de ces différents génotypes indique qu'ils appartiennent tous à des variants génotypiques ayant émergé quelques années avant leur dissémination dans la population (**Publication n°2, Figure 4**).

ARTICLE

Variations in Cerebrospinal Fluid Viral Loads Among Enterovirus Genotypes in Patients Hospitalized With Laboratory-Confirmed Meningitis Due to Enterovirus

Romain Volle¹, Jean-Luc Bailly^{1,2}, Audrey Mirand^{1,2}, Bruno Pereira³, Stéphanie Marque Juillet⁴,
Martine Chambon^{1,2}, Christel Regagnon², Amélie Brebion^{1,2}, Cécile Henquell², Hélène Peigue-
Lafeuille^{1,2}, and Christine Archimbaud^{1,2*}

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EPIE, EA4843, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, CNR *Enterovirus/Parechovirus* laboratoire associé, F-63003 Clermont-Ferrand, France

³CHU Clermont-Ferrand, Délégation Recherche Clinique Innovation, F-63003 Clermont-Ferrand, France

⁴CH Versailles, Laboratoire de Microbiologie, 78157 Le Chesnay, France

The Journal of Infectious Diseases 2014 Mar 20. [Epub ahead of print]

VOIR ANNEXES

Commentaires des travaux

L'originalité de notre travail tient au nombre de patients ($n = 156$), à la présence des quatre classes d'âge (nouveau-né, nourrisson, enfant, adulte) et à l'aspect prospectif de l'étude. Le résultat innovant est l'existence d'une corrélation entre la charge virale EV et les 7 génotypes majoritaires retrouvés. Les deux limites principales de l'étude sont les suivantes.

(1) Compte tenu du nombre élevé de génotypes responsables des méningites, on peut se demander si les résultats concernant 7 d'entre eux sont représentatifs. Une étude de plus grande ampleur serait nécessaire pour répondre à cette interrogation. On peut noter que dans notre étude les deux charges virales liées aux infections à EV-A71, génotype considéré comme l'un des plus neurotropes, sont élevées (5,68 et 7,05 \log_{10} copies/ml).

(2) La deuxième limite a été révélée par l'étude phylogénétique. Celle-ci montre que chaque génotype a été représenté en réalité par un variant phylogénétique pendant la période d'étude. Ceci amène la question suivante : les charges virales déterminées sont-elles représentatives du génotype ou du variant représenté lors de l'étude ? Les données obtenues pour l'E-6 sont en faveur de la seconde possibilité. Le variant épidémique d'E-6 (variant 2011) est lié à des charges virales plus faibles non seulement par rapport aux autres génotypes d'EV mais aussi par rapport à 2 souches d'E-6 qui appartiennent à un autre variant. L'analyse de la région 5'NC des génomes E-6 n'a révélé aucun mésappariement des amorces et de la sonde, et la taille des amplicons et du GC% ont les valeurs attendues. Ceci élimine un biais d'amplification et suggère l'hypothèse d'une corrélation entre la charge virale dans le LCR et le profil infra génotypique des E-6. Ce dernier point est détaillé dans la dernière partie de la thèse (**cf. page 175**).

Une autre question est l'intérêt clinique de la charge EV dans le LCR ? Au regard de certaines atteintes cérébrales, une méningite à EV est une infection rapidement limitée par les réponses immunitaires et déterminer la charge virale ne présente pas d'intérêt diagnostique. Les méningites constituent un modèle d'étude de l'atteinte du système nerveux central et déterminer la charge virale est nécessaire pour identifier les processus physiopathologiques. Déterminer la charge virale dans le LCR lors du diagnostic des infections néonatales pourrait cependant avoir un intérêt, car les infections à EV chez les nouveau-nés peuvent être sévères et à l'origine de séquelles [**Abzug et al., 2013**]. Notre étude et les travaux de **Kawashima et al., [2008]** montrent que les nouveau-nés présentent des charges virales plus élevées que d'autres classes d'âge de sorte que nous ne pouvons pas d'exclure un facteur lié à l'âge.

La charge virale EV dans le LCR prend toute son importance lors d'infections cérébrales sévères et chroniques (patients immunodéprimés ou agammaglobulinémiques) [Bailly *et al.*, 2000b ; Archimbaud *et al.*, 2003]. Par ailleurs, déterminer la charge virale dans le sang permettrait de suivre l'évolution de l'infection au cours du temps lorsque des traitements génériques sont institués. Enfin, les recherches et le développement d'antiviraux spécifiques (*eg.* EV-A71) bénéficieraient de pouvoir déterminer les charges virales dans le LCR pour évaluer l'efficacité de ces traitements lors d'essais cliniques.

Au cours de notre étude prospective, nous avons exclu 46 patients, chez lesquels la charge virale était en dessous de la limite de quantification reproductible (1875 copies/ml). Nous avons recherché les points communs entre ces patients dont les charges virales étaient faibles. Le principal facteur commun est le génotype du virus : l'E-6 variant 2011 représente 39% de l'effectif et l'E-30, 11%. Les prélèvements de LCR ne contenaient pas d'inhibiteur et l'analyse comparée des séquences de la région 5'NC des E-6 ne fait pas apparaître de mésappariements avec les amorces et les sondes utilisées. A noter que le génotype n'a pas pu être identifié chez 25% des patients et les causes n'ont pas pu être déterminées.

L'implication de facteurs autres que le virus est également à prendre en compte. Lorsque l'on compare les 46 patients au groupe des 156 patients inclus dans l'étude, nous n'avons pas trouvé de différence parmi les tranches d'âges. Il n'y a pas non plus de différence dans le nombre de leucocytes dans le LCR, dans l'intervalle de temps entre le début des symptômes et la ponction lombaire, dans le délai technique entre la ponction lombaire et l'arrivée du prélèvement dans le laboratoire ou bien encore le temps d'analyse et de rendu des résultats. Il apparaît une différence significative de la protéinorachie ($p=.03$). Les patients exclus de l'étude à cause de charges virales trop faibles présentent des concentrations protéiques dans le LCR moins élevées : 62% d'entre eux ont des valeurs normales (contre 48% pour l'autre groupe). Dans la littérature, deux explications sont avancées pour expliquer une élévation de la protéinorachie dans le LCR.

(1) Une perméabilisation de la barrière hémato encéphalique [Oreskovic et Klarica, 2010]. Il est possible que cette perméabilisation soit moindre chez certains patients, pendant le processus inflammatoire neuro-méningé. Cette hypothèse implique implicitement un rôle direct ou indirect de la barrière hémato encéphalique dans l'infiltration du virus dans le LCR.

(2) Le LCR est produit quotidiennement à raison de 500 à 1200 ml et il est renouvelé en moyenne toutes les 6 à 8 heures [Sakka *et al.*, 2011]. Au cours d'atteintes infectieuses, le

renouvellement pourrait être ralenti conduisant à une accumulation des protéines dans le LCR
[Reiber, 2003].

Interaction des entérovirus avec un modèle cellulaire de barrière hémato-encéphalique

La majorité des géotypes EVs peuvent être associés à des infections neurologiques, pour autant leur caractère neurotrope reste mal défini et les processus d'entrée dans le SNC peu connus. Dans ces travaux, nous avons exploré l'hypothèse de la translocation des EVs vers le SNC *via* un processus de franchissement de la barrière hémato encéphalique. Ce travail se fonde sur l'observation que les atteintes méningées des EVs sont liées à la présence du virus dans le sang (**données du laboratoire obtenues au cours de la thèse**) et sur la notion ancienne de la virémie dans les infections à EVs [Sabin, 1956 ; Bodian, 1955]. Pour cette étude exploratoire, nous avons utilisé la lignée endothéliale microvasculaire cérébrale hCMEC/D3 comme modèle *in vitro* d'endothélium cérébral microvasculaire humaine [Weksler et al., 2005]. La stratégie analytique a été subdivisée en 3 parties complémentaires afin de répondre aux questions suivantes : Quels virus ? Quelles conséquences ? Quels mécanismes ?

Du fait de la diversité des EVs et du grand nombre de géotypes associés à des atteintes neuro-méningées, nous avons opté pour une stratégie d'étude privilégiant des tests généraux pour un grand nombre d'EVs au lieu de nous focaliser sur une souche particulière et d'en disséquer toute la mécanistique moléculaire (**Manuscrit, Figure S1**). A cette fin, 88 souches d'EVs (44 géotypes différents, majoritairement EV-B) ont été sélectionnées par une analyse phylogénétique. Nous avons choisi une souche par génogroupe de chaque géotype disponible. Toutes les souches ont été testées sur les cellules hCMEC/D3 à une multiplicité infectieuse (MOI) uniforme de 5 pour l'ensemble des expérimentations. Cette MOI a été choisie afin que chaque cellule puisse être statistiquement infectée, sans pour autant les saturer. Dans la même optique, les tests ont tous été conduits sur des cellules hCMEC/D3 dont le nombre de passages était compris entre 30 et 34 afin de maintenir leurs propriétés de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Les principaux résultats de cette étude sont décrits ci-dessous.

• Permissivité des cellules hCMEC/D3 non polarisées pour une large gamme d'EVs

La permissivité des cellules hCMEC/D3 (non polarisées), c'est-à-dire les caractéristiques qui les rendent aptes à une infection et à maintenir le cycle viral jusqu'à la production de virus infectieux a été mise en évidence par plusieurs méthodes transversales (**Manuscrit, Figure S1**).

(1) Les quantités de génomes et de particules virales infectieuses ont été déterminées 24h après le début de l'infection (tests en duplicats) et les valeurs normalisées par rapport à la densité de cellules inoculées. Les deux quantités sont comprises entre $-3,07$ à $3,06 \log_{10}$ particules virales par cellule et $-1,42$ à $6,08 \log_{10}$ copies de génomes viraux par cellule et elles sont positivement corrélées (Spearman's rho 77%, p-value <0.001) (**Manuscrit, Figure 1A**). Des cinétiques de production d'ARN viraux réalisées pour quelques souches représentatives ont permis de valider ces résultats (**Manuscrit, Figure 1B**).

(2) La proportion de cellules infectées par différents EVs a été déterminée en triplicat par immunofluorescence après 6h d'infection. Le temps de 6h a été choisi sur la base des résultats des cinétiques de multiplication virale pour observer les caractéristiques de l'infection initiale en amont de la production de virus *de novo* tout en garantissant une sensibilité suffisante pour la détection des cellules primo infectées lors de l'inoculation. Nos résultats indiquent que la lignée hCMEC/D3 présente une permissivité à un large éventail de génotypes d'EV, mais il existe une grande hétérogénéité selon les souches (**Manuscrit, Figure 1C**).

(3) Enfin nous avons cherché à caractériser de façon qualitative et quantitative la mortalité cellulaire induite par 15 souches d'EV, choisies d'après l'intensité des ECP observés à 24h. Nos résultats indiquent un engagement de l'apoptose et de la nécrose avec une grande hétérogénéité entre les souches. L'EV-A71 est le seul virus à ne pas induire un taux de mortalité cellulaire significativement supérieur à 9,6% mesuré pour les cellules témoins (**Manuscrit, Figure 1D**).

L'hétérogénéité des résultats selon les souches accroît la difficulté d'une interprétation globale par type d'EV. Cependant, comme les variables étudiées présentent toutes le même dénominateur commun à savoir la cellule hCMEC/D3, il est possible de les comparer dans une analyse statistique multidimensionnelle. Cette analyse permet de représenter la disposition des souches d'EV les unes par rapport aux autres, en fonction du poids exercé par les différentes variables au sein d'un espace graphique (**Manuscrit, Figure 2 et S2**). Nos résultats indiquent que les cellules hCMEC/D3 présentent un degré de permissivité différent pour les EVs en fonction de caractéristiques infra génotypiques qui restent à déterminer. A partir de ce résultat, nous avons pu sélectionner différentes souches représentatives pour poursuivre l'étude.

• Franchissement d'un pseudo endothélium par les EVs

Pour étudier la réplication des EVs dans un modèle *in vitro* de barrière endothéliale cérébrale, les cellules hCMEC/D3 ont été cultivées sur une membrane micro poreuse (Transwell®) jusqu'à obtenir une monocouche polarisée et étanche (**Manuscrit, Figure S3**). Cette dernière sépare un espace luminal (représentant le compartiment sanguin) et un espace abluminal (définissant l'espace périvasculaire). Après 5 à 7 jours de culture, la multiplication virale dans les barrières endothéliales a été testée pour 10 souches d'EV, après inoculation par la face luminale. La réplication et la sortie de virus infectieux par les faces luminale et abluminale des barrières ont été analysées par RT-qPCR et titrage dans les surnageants renouvelés périodiquement. En parallèle, l'intégrité structurale et l'étanchéité des barrières endothéliales ont été analysées par microscopie électronique à balayage et la mesure de la vitesse de clairance d'un fluorophore (Lucifer Yellow).

Deux profils différents ont été mis en évidence.

Profil 1. Les barrières endothéliales présentent une infection rapide et lytique par les E-6, E-11, E-30 et E-12 ; l'infection est liée à un taux de mortalité cellulaire significativement élevé par apoptose et nécrose (**Manuscrit, Figures 3A à 3D**).

Profil 2. Une infection limitée et prolongée (au moins 96h) des barrières endothéliales par les EV-A71, CV-A5, CV-B3 et CV-B5 sans perte d'intégrité (EV-A71, **Manuscrit, Figures 3E et 3F** ; CV-A5 et CV-B5, **Figure S5**).

Concernant les CV-B, les résultats sont encore préliminaires. Un bilan global des 10 souches testées est présenté dans le tableau ci-dessous.

TABLE 4 Résultats obtenues sur les cellules hCMEC/D3 non polarisées pour les souches entérovirus testées sur pseudo endothelia

Caracteristiques	entérovirus souches par genotype ^a									
	Translocation destructive du pseudo endothélium					Translocation non destructive du pseudo endothélium				
	E-6	E-11	E-12	E-30		EV-A71	CV-A5	CV-B5	CV-B3	
hCMEC/D3 non polarisées	CF2660-00	CF158061-11	CF226048-06	CF1157-91	CF2575-00	CF166105-10	CF160019-10	CF193056-11	CF202076-05	CF192061-05
Copies de génome par cellules à 24h (log)	5,02±0,15	4,64±0,06	4,75±0,13	5,46±0,15	3,85±0,26	4,50±0,45	4,51±0,06	2,44±0,56	-0,39±1,45	2,46±0,39
Particules infectieuse par cellules à 24h (log)	2,67±0,26	2,11±0,11	1,77±0,19	2,86±0,11	1,31±0,05	-0,43±0,40	-0,41±0,66	-0,34±0,25	-1,13±0,37	-1,20±0,14
% de cellules infectées à 6h	43,8±10,6	14,0±3,7	20 cellules/cm²	24,3±5,0	7,5±0,9	2,2±1,4	1,3±0,8	Ind	Ind	Ind
% de mortalité cellulaire à 24h ^b	46,8±5,8	30,4±3,8	nr	48,13±8,3	29,1±1,26	10,7±3,2	nr	nr	nr	nr

les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type

Abbreviation: nr, non réalisé; Ind, indéterminé

^a Genotype : echovirus (E), coxsackievirus (CV), entérovirus (EV)

^b Moyennes cumulées d'apoptose de nécrose et de débris nucléaires

• Altérations intracellulaires

Dans un troisième temps, nous nous intéressé aux altérations intra cellulaires présentées par les cellules hCMEC/D3 infectées en utilisant différentes techniques de microscopie. Malgré toute la diversité des profils d'infection observés dans les analyses précédentes, les cellules présentent des caractéristiques communes pour tous les virus testés. Les observations en microscopie confocale

(16 souches) et électronique (4 souches) ont montré : une induction de vésicules tendant à s'organiser en structures évocatrices d'usines virales (**Manuscrit, Figures 5 et 6**), une perte du cytosquelette d'actine (**Manuscrit, Figure 7**) et une relocalisation des mitochondries dans un espace périnucléaire (**Manuscrit, Figure 8**).

MANUSCRIT

En preparation

Differential permissivity of the hCMEC/D3 cell line to a range of neurotropic enteroviruses and specificities of enterovirus 71 in crossing an in vitro model of human blood brain barrier

Romain Volle¹, Christine Archimbaud^{1,2}, Pierre-Olivier Couraud⁴, Ignacio A. Romero⁵, Babette Weksler⁶, Audrey Mirand^{1,2}, Bruno Pereira³, Cécile Henquell², Hélène Peigue-Lafeuille^{1,2}, and Jean-Luc Bailly^{1,2*}

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EPIE, EA 4843, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, CNR Enterovirus/Parechovirus laboratoire associé, F-63003 Clermont-Ferrand, France

³CHU Clermont-Ferrand, Délégation Recherche Clinique Innovation, F-63003 Clermont-Ferrand, France

⁴Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

⁵Department of Life, Health and Chemical Sciences, Open University, Milton Keynes, U.K

⁶Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

VOIR ANNEXES

Commentaires des travaux

Le choix de la lignée endothéliale microvasculaire cérébrale hCMEC/D3 a été guidé par sa très large utilisation comme modèle *in vitro* de barrière endothéliale cérébrale [Weksler et al., 2013]. Elle est utilisée dans des études portant sur la physiologie ou le métabolisme de la BHE, des travaux liés à l'immunité et aux réponses pharmacologiques impliquant la BHE [eg : Cucullo et al., 2008 ; Hatherell et al., 2011]. La lignée est aussi utilisée pour étudier les réponses aux infections par des agents pathogènes [Sabiiti et May, 2012 ; Jambou et al., 2010 ; Huang et al., 2008].

Notre premier objectif a été de tester la permissivité de la lignée hCMEC/D3 vis-à-vis des EVs pour examiner la translocation des virus entre les deux compartiments d'une barrière endothéliale, consécutivement à l'infection des cellules. Nous avons comparé 88 souches d'EVs de 44 génotypes représentant les 4 espèces virales. Cette stratégie volontairement exploratoire avait pour but d'apporter une première réponse sur les effets de la diversité des EVs humains et leurs propriétés à être disséminés au SNC. Les souches (prototypes et cliniques) ont été sélectionnées selon des critères phylogénétiques et épidémiologiques. Nous avons inclus des souches des génotypes importants sur un plan épidémiologique, par exemple : E-6, E-11, E-30 pour les méningites aiguës et EV-A71 pour les encéphalites associées au syndrome pied-main-bouche. Différents génotypes de CVB ont aussi été inclus pour les infections néonatales. Des souches de génotypes moins fréquents ont aussi été analysées. Pour certains génotypes, nous avons inclus des souches de différents génogroupes pour représenter la diversité intra génotypique.

Les résultats amènent trois commentaires principaux.

(1) La quantité de virus produite en 24h indique une grande hétérogénéité entre les souches d'EVs et a permis de remarquer qu'il existe une corrélation forte entre la concentration de génomes et celle des particules virales infectieuses (77% ; $p < .001$). Un écart moyen d'un facteur 1000 existe entre les concentrations de génomes et de particules. Les variations de cet écart entre les souches peuvent être le reflet : de génomes non encapsidés ou défectifs, de l'agrégation des particules virales, des particules virales non infectieuses et de la variabilité plus importante liée au titrage viral (manuel) par rapport à la détection génomique semi-automatisée.

(2) Il existe une forte dépendance de l'efficacité de l'infection (déterminée par immunomarquage des cellules infectées 6 heures après l'inoculation) selon les souches : la proportion de cellules infectées varie de quelques cellules à plus de 50%. Cet effet peut être observé

pour des souches de même génotype qui utilisent, selon toute vraisemblance, les mêmes récepteurs membranaires. Bien que les proportions de cellules infectées soient corrélées à la mortalité cellulaire viro-induite, la proportion de cellules infectées telle que nous l'avons mesurée doit être relativisée car elle reflète uniquement l'expression et la maturation de la protéine de capsid VP1. Ces résultats mériteraient d'être complétés par d'autres marqueurs viraux, protéines non structurales et ARN négatif (ou bicaténaire) généré lors de l'étape de réplication.

(3) L'hétérogénéité entre les souches d'un même génotype a été confirmée par les différences entre les taux de mortalité cellulaire à 24h déterminés par cytométrie en flux. Les résultats concernant les proportions variables de cellules nécrotiques et apoptotiques mises en évidence parmi les souches ouvrent une voie d'étude qui mérite d'être approfondie. Des observations en microscopie confocale (données non présentées) indiquent un engagement de l'apoptose dépendante des caspases (caspase 3), *via* la voie intrinsèque (caspase 9) ou extrinsèque (caspase 8). Ces résultats pourraient être complétés en analysant comment et à quels stades l'apoptose est bloquée au cours de l'infection et si les variations observées relèvent de différences entre les souches, les génogroupes ou les génotypes d'EV.

L'étude réalisée n'aborde pas un aspect crucial de l'infection, à savoir l'entrée du virus dans la cellule. Un criblage de l'expression des récepteurs utilisés par les EVs (par exemple en utilisant conjointement les techniques de Western Blot et de microscopie confocale) permettrait de déterminer les génotypes susceptibles d'infecter les cellules hCMEC/D3 et de mieux cerner l'hétérogénéité de la proportion de cellules infectées. On ne peut pas exclure l'hypothèse que l'hétérogénéité des profils d'infection soit liée à la transformation des cellules hCMEC/D3. Cette hypothèse pourrait être étudiée en utilisant des cellules endothéliales cérébrales primaires.

Notre second objectif a été de tester la translocation virale à travers un modèle de barrière endothéliale cérébrale. La barrière endothéliale obtenue en cultivant les cellules hCMEC/D3 à la surface d'une membrane microporeuse a été validée en microscopie électronique par la présence de jonctions serrées, en microscopie électronique à balayage et par les mesures de la perméabilité paracellulaire. Les variations mises en évidence entre le groupe des virus rapidement lytiques et l'EV-A71 ne peuvent pas être imputées à des variations dans la barrière elle-même.

Les génotypes E-30, E-6, E-11 et E-12 présentent des caractéristiques similaires. L'augmentation de la perméabilité paracellulaire des barrières infectées par ces virus est la conséquence directe de la proportion élevée de cellules qui entrent en apoptose et en nécrose en

moins de 24 heures, ce qui conduit à une libération importante de virus infectieux dans les compartiments luminaux et abluminaux. Un point intéressant ressort de l'analyse de cette libération. Dans l'étape précoce de l'infection jusqu'à 6 h, nous observons une forte libération abluminale de génome viral, 10000 fois plus élevée que la quantité des particules infectieuses. L'absence de modification de la perméabilité exclue un passage paracellulaire du virus présent dans le compartiment luminal. De plus, cet écart entre les quantités de génomes et de virus diminue par la suite. Nous avançons l'hypothèse que les premières étapes de l'infection sont associées à une libération abluminale de génomes viraux non encapsidés ou de particules virales non infectieuses. A l'appui de cette observation, des travaux antérieurs sur l'entrée des CV-B3 et PV-1 dans des cellules microvasculaires cérébrales polarisés démontrent que l'endocytose dépendante de la cavéoline-1 et 2 est initiée pour internaliser les particules virales [Bozym et al., 2010 ; Coyne et al., 2007]. Mais la caveoline-1 est également utilisée dans des mécanismes de transcytose [Cardoso et al., 2010]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une libération prématurée des génomes viraux par un mécanisme de transcytose endothéliale viro-induite.

Les barrières endothéliales infectées par les souches des génotypes CVB, EV-A71 et CV-A5 présentent un profil nettement différent car leur perméabilité n'est pas affectée par l'infection virale. Ce profil peut être la conséquence du nombre limité de cellules infectées. Le virus infectieux est libéré dans les compartiments luminaux et abluminaux avec un pic à 24 h. Puis, cette libération diminue significativement par la suite, mais reste détectable au moins jusqu'à 96 h. Un profil identique a été obtenu pour l'EV-A71 en réalisant les inoculations à une multiplicité infectieuse de 100. Ces résultats permettent de conclure que ce deuxième groupe de virus induit une réplication faible mais prolongée, sans rupture de la barrière et que l'infection présente un type persistant.

Les limites principales de cette étude sont de trois ordres. **Limite technique** tout d'abord, la mesure de la perméabilité paracellulaire par la clairance d'un fluorophore présente des contraintes inhérentes à son protocole : prélèvement des surnageants, lavages multiples des cellules... Ces contraintes rendent impossible un suivi précis des variations de la perméabilité au cours de l'infection virale et des études à plus grande échelle. La mesure de la résistance électrique transendothéliale, plus souple et rapide permettrait d'analyser les modifications de la barrière endothéliale. **Limite méthodologique** ensuite concernant l'infection par l'EV-A71. Nous montrons une réplication prolongée du génome dans la barrière endothéliale intacte mais nous n'avons pas contrôlé l'évolution du nombre total des cellules au cours de l'infection. Par ailleurs, le nombre apparemment limité de cellules infectées est basé sur la détection de la protéine de capsid VP1.

Déterminer le nombre de cellules qui répliquent effectivement le génome viral est un point important à clarifier. **Enfin**, nous mettons en évidence une translocation des EVs consécutive à une inoculation par la face luminale, mais la réciproque est-elle vraie ? Quelques tests préliminaires ont été réalisés et justifieraient une analyse de cet aspect.

Le troisième objectif concernait l'étude des caractéristiques intra cellulaires générales des cellules infectées par des techniques de microscopie. Les cellules infectées par des souches de génotypes comme E-6, E-30 et E-12 présentent les caractéristiques typiques d'une infection par un picornavirus. Les noyaux sont déformés, condensés et repoussés en périphérie de la cellule. Un remodelage membranaire massif se produit pour former des structures multivésiculaires à simple ou double membrane, organisées en amas condensés. Des agrégats de capsides virales sont situés entre les vésicules et les mitochondries sont regroupées près de l'amas multivésiculaire. En revanche, les cellules infectées par l'EV-A71 présentent un certain nombre de différences structurales : les noyaux ne sont pas modifiés et les vésicules viro-induites ont une plus grande taille, une forme ronde, régulière et une structure multilamellaire.

Les effets cytotoxiques intracellulaires induits par 16 génotypes d'EV ont été explorés par microscopie confocale. Les cellules infectées présentent des profils communs à tous les génotypes et coïncident avec la synthèse active de protéines virales près du noyau. On note une dépolymérisation précoce de l'actine, qui pourrait être associée à l'élévation de la perméabilité paracellulaire. On constate aussi une réorganisation du réseau des mitochondries dans la zone périnucléaire.

En conclusion, deux groupes de virus ont été caractérisés lors de ce criblage. Les caractéristiques communes aux deux groupes concernent les aspects généraux de l'infection virale : dépolymérisation du réseau d'actine, relocalisation des mitochondries fonctionnelles à proximité des amas multivésiculaires.

Le premier groupe comprend les virus cytocides causant la mort des cellules par nécrose et apoptose. Les barrières de cellules hCMEC/D3 sont rapidement infectées par les souches de ce groupe et produisent du virus infectieux. L'infection se traduit par une modification de la perméabilité de la barrière en 24 heures.

Le second groupe comprend des souches faiblement infectieuses par la voie apicale et peu cytotoxiques. Ces virus dont l'EV-A71 provoquent une infection prolongée d'un nombre restreint de cellules mais n'entraînent pas une altération profonde de la structure des barrières endothéliales ni de leur perméabilité.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Arrachez vos questions au terreau où elles ont germé et vous verrez pendre leurs racines

La Maison des Mères (1979) Franck Herbert

Les processus pathogéniques des infections à EV sont complexes parce que ces virus se multiplient séquentiellement et/ou simultanément dans plusieurs tissus (épithélium de l'oropharynx et de l'intestin grêle, tissus lymphoïdes associés). L'existence d'une virémie au cours des infections à EVs est connue depuis longtemps mais son rôle dans la dissémination intra individuelle du virus est mal connu. L'entrée des EVs dans le SNC, l'importance quantitative de la charge virale dans le LCR et sa corrélation éventuelle avec l'intensité de la réponse inflammatoire sont peu étudiées.

Une étude prospective de la charge virale dans le LCR pendant la phase aiguë de l'infection clinique a constitué notre première approche pour mieux caractériser la pathogénie des méningites à EV. Dans une seconde approche, nous avons étudié les modalités d'infection et le franchissement par les EVs d'un modèle d'endothélium cérébral établi avec la lignée cellulaire endothéliale microvasculaire hCMEC/D3 d'origine humaine. Les aspects des infections neuro-méningées à EVs abordés dans cette thèse, concernent donc deux niveaux très différents : l'infection *in vivo* à une échelle intra individuelle et l'infection *in vitro* dans un type cellulaire précis. Bien que les deux études soient complémentaires, leurs résultats ne peuvent être rapprochés qu'avec prudence.

Pathogénie des méningites aiguës et caractéristiques génétiques des entérovirus

L'étude d'une population de 156 patients hospitalisés ayant présenté une méningite aiguë entre janvier 2008 et décembre 2012 révèle un ensemble de 24 génotypes d'EV. La grande diversité des EVs pendant une période relativement longue n'est pas surprenante puisque plusieurs génotypes co-circulent pendant la même année, à l'échelle d'un pays comme la France. L'originalité de l'étude est la mise en évidence pour la première fois, d'une relation entre la charge virale dans le LCR et le génotype du virus responsable de la méningite. Par exemple, les génotypes E-30 et CVB sont reliés à des charges virales plus élevées, comparativement aux génotypes E-6 et E-11. Une erreur serait de considérer que les différences de charges virales sont uniquement liées à des caractéristiques génotypiques. En fait, ces différences pourraient refléter des caractéristiques infra génotypiques, rattachées au génogroupe. La connaissance précise de la phylogénie des EVs a permis de remarquer que les souches d'E-6 responsables des méningites en 2011, constituent un variant distinctement différent des lignées qui ont circulé auparavant. Un scénario identique s'est reproduit en 2012 avec l'E-11, ce qui ne peut pas être la conséquence du hasard. Un troisième argument en faveur d'un lien entre la charge virale et le génogroupe concerne la moins grande hétérogénéité des charges virales reliées à l'E-30 et le fait que ce soit la même lignée qui circule depuis 2005 (données du laboratoire). Compte tenu de la diversité des génogroupes d'EV responsables d'épidémies de méningites aiguës, seule une étude collaborative à une plus grande échelle permettrait de diversifier

l'échantillonnage et de préciser les différents aspects reliant la phylogénie des EVs et leurs caractéristiques pathogéniques.

D'autres caractéristiques moins spécifiques sont à prendre en compte, comme le suggère un autre résultat de notre étude. Nous montrons en effet que les patients ont une charge virale et une pléiocytose plus élevées lorsqu'ils présentent une méningite à CVB. Ceci nous conduit à l'hypothèse que chez ces patients la charge virale proviendrait des lymphocytes infectés, car les CVB ont un lymphotropisme marqué [Matteucci et al., 1985 ; Mena et al., 1999]. A noter qu'au cours de cette étude, nous avons aussi déterminé la charge virale dans le sang, plus précisément dans le plasma pour une partie des patients. Ceci indique que lors de la virémie, une partie au moins du virus est retrouvée en suspension dans la fraction plasmatique.

Cette hypothèse du cheval de Troie lymphocytaire est plutôt en accord avec les résultats de notre étude *in vitro* qui montrent la faible multiplication des CVB dans les cellules hCMEC/D3. Il est possible que l'infection des cellules endothéliales soit plus efficace *via* des lymphocytes infectés que par des CVB libres car leur récepteur CAR est localisé dans les jonctions serrées. Ces différentes hypothèses pourront être explorées *in vitro* à l'aide du modèle de BHE [Weksler et al., 2005 ; 2013], en étudiant la transmigration de lymphocytes infectés et ses conséquences en terme de perméabilité paracellulaire et d'efficacité de l'infection la barrière endothéliale.

Atteintes de la BHE lors des infections à entérovirus

Peut-on détecter des atteintes de la BHE avec les données obtenues chez les patients ? L'élévation de la protéinorachie dans le LCR pourrait être un indicateur d'une perméabilisation de la BHE [Oreskovic et Klarica, 2010] mais elle peut aussi être la conséquence d'une réduction du débit du LCR, ce qui provoquerait une accumulation transitoire des protéines [Reiber, 2003]. La réponse inflammatoire à l'infection virale peut aussi être la cause de l'élévation de la concentration des protéines du LCR. Lors de conditions pathologiques, l'endothélium microvasculaire cérébral sécrète diverses cytokines (IL-1 et IL-6 ou TNF α), des métalloprotéases de la matrice (MMP) qui vont fragiliser les lames basales et faciliter la migration des leucocytes [Dobbie et al., 1999 ; Ostermann et al., 2002 ; Alvarez et al., 2013]. Il est possible que cette réaction immunitaire endothéliale soit reliée à la cytotoxicité de l'EV. Les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le LCR au cours des méningites à E-30 sont IL-6, IL-8 et IFN- γ au cours de la phase aiguë de l'infection, puis sont remplacées par les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β 1 [Sato et al., 2000]. Une étude réalisée sur un petit nombre de patients indique un pic transitoire d'IL-6 dans le LCR, qui diminue lorsque la charge virale augmente [Kawashima et al., 2008]. Les aspects

inflammatoires constituent une perspective importante à notre travail. L'analyse quantitative des cytokines et des leucocytes dans le LCR en relation avec la charge virale permettrait de cerner l'origine du virus.

Franchissement de l'endothélium microvasculaire cérébral par les entérovirus

Nous montrons que les cellules d'une barrière endothéliale formée *in vitro* avec les cellules hCMEC/D3 sont infectées de façon productive par plusieurs EVs et que l'infection se traduit par la diffusion des virus au-delà de la barrière endothéliale. Deux types de franchissement ont été observés et sont liés à des conséquences diamétralement différentes sur l'intégrité de la barrière. L'infection par des EVs cytotocides se traduit par une modification de l'étanchéité de la barrière en 24 heures, puis sa destruction. A l'opposée, l'infection par des EVs peu cytotoxiques n'entraîne aucun effet sur la perméabilité bien que la multiplication virale se poursuive à faible rendement pendant au moins 96 heures. Un aspect important est que les EVs particulièrement cytotoxiques regroupent des génotypes fréquemment impliqués dans des syndromes méningés (E-30, E-6, E-11) et les EVs peu cytotoxiques regroupent des génotypes neurotropes pouvant être associés à des atteintes profondes du SNC (EV-A71 et CVB). Existerait-il un lien inverse entre la cytotoxicité des EVs pour l'endothélium microvasculaire ou même un autre site à proximité du parenchyme cérébral et le type des atteintes observées : méningite, méningo-encéphalite, encéphalite ? Sans ignorer toutes les limites que ce rapprochement peut avoir, les données de l'étude de la charge virale dans le LCR iraient dans le sens de cette hypothèse. Contrairement à l'E-30, l'E-6 variant 2011 est lié à une charge virale particulièrement faible, pourtant ces deux virus ont été à l'origine d'épidémies de méningites en France, dont les caractéristiques cliniques étaient similaires. Nous montrons que les caractéristiques cytotocides de l'E-6 sont équivalentes voire plus marquées que celles de l'E-30.

Un autre prolongement de l'étude *in vitro* du franchissement de l'endothélium cérébral par les EVs consiste à étudier la perméabilité des cellules hCMEC en présence des autres types cellulaires qui constituent l'unité neurovasculaire par co-culture de cellules. Les péricytes et les astrocytes participent à l'établissement des jonctions serrées endothéliales et au maintien de l'intégrité de l'endothélium [Abbot et al., 2006 ; Obermeir et al., 2013 ; Cardoso et al., 2010 ; Hamm et al., 2004 ; Hatherell et al., 2011]. De plus, les pieds astrocytaires qui forment un manchon autour de l'endothélium microvasculaire pourraient constituer une seconde barrière. Dans cette hypothèse, on peut penser que la barrière astrocytaire puisse limiter la diffusion des EVs au niveau des espaces périvasculaires, de sorte que les particules virales seraient drainées par le liquide interstitiel vers les

espaces sous arachnoïdiens. Des atteintes plus profondes du SNC pourraient se produire si cette barrière astrocytaire peut être infectée ou si des particules virales peuvent diffuser au-delà. A noter que la sensibilité de 3 lignées d'astrocytes humains a été montré *in vitro* pour les génotypes CV-B3 et EV-A71, ainsi que le CV-A9 [Kung et al., 2007 ; Zhang et al., 2013].

Les perspectives de cette étude peuvent également être envisagées à une échelle plus large. En effet, de nombreux génotypes d'EVs présentent un tropisme pour d'autres types de tissus endothéliaux. Cellules HUVEC [Conaldi et al., 1997 ; Saijets et al., 2003 ; Ylipaasto et al., 2010], endothélium cardiaque [Huber et al., 1990], endothélium dermal [Zanone et al., 2003 ; Liang et al., 2004]. En ajoutant à cette liste l'endothélium microvasculaire cérébral, une intéressante perspective consiste à comparer la permissivité de cellules endothéliales primaires de différentes origines tissulaires avec des souches cliniques d'EVs. Des différences dans leurs profils « endothéliotropes » apporterait des éléments clefs pour expliquer la pathologie retrouvée.

Caractéristiques de l'infection des cellules hCMEC/D3 et relations avec le pouvoir pathogène des entérovirus

Les cellules hCMEC/D3 peuvent être infectées par un grand nombre d'EVs de différents génotypes. Les effets cytotoxiques de 88 souches d'EVs issus de différents génogroupes parmi 44 génotypes ont été évalués. A notre connaissance c'est le plus grand échantillon d'EVs jamais testé sur des cellules endothéliales. Ceci constitue d'ailleurs la force et la faiblesse de cette étude. Le point fort étant que l'on peut se placer au niveau de la diversité des EVs. L'inconvénient est que nos résultats sont descriptifs, et n'autorisent, pour le moment, que des extrapolations sur les mécanismes moléculaires sous jacents aux processus infectieux.

Différents éléments liés à la fois à l'hôte et au virus peuvent être mis en avant pour expliquer la diversité des atteintes cellulaires observées. La sensibilité des cellules peut varier selon le génotype en fonction des récepteurs membranaires utilisés par le virus. Les EVs *via* leurs protéines de capsid utilisent une large gamme de récepteurs. Par ailleurs, l'usage de co-récepteurs particuliers (CD55, intégrines $\alpha V\beta 3$ ou $\alpha V\beta 6$) peut potentialiser l'entrée du virus. Des modifications post traductionnelles du récepteurs peuvent aussi modifier son affinité avec des variants viraux d'un même génotype [Mistry et al., 2011 ; Nishimura et al., 2010]. Lorsque la cellule est infectée, elle dispose de plusieurs moyens de défense antivirale et les EVs présentent la souplesse génétique suffisante pour perturber voire inhiber ces processus cellulaires *via* leurs protéines non structurales, protéases en particulier. Une compétition se met en place à l'échelle intra cellulaire et trouve une résolution paroxystique sous la forme de l'effet cytopathique [Agol, 2012].

Des expériences avec les cellules Hela infectées par le mengovirus (autre picornavirus) montrent qu'un « désarmement mutuel » *via* une inhibition de l'apoptose et une mutation défective de la protéine virale L permet une amélioration significative de la survie cellulaire, sans pour autant abolir la réplication virale [Mikitas et al., 2012].

Un autre aspect de cette étude, révélé par la combinaison de différentes techniques de microscopie, a montré les caractéristiques intra cellulaires communes de l'infection par les EVs. Nos observations en microscopie électronique à balayage confirment l'induction de l'apoptose et de la nécrose lors de l'infection des cellules hCMEC/D3, et révèlent la présence de brèches dans les barrières endothéliales *in vitro*, y compris pour l'EV-A71. Pour ce virus, l'absence de destruction notable de la barrière, est liée à la faible proportion des cellules dans lesquelles l'infection est productive. Dans les cellules endothéliales, la dynamique des protéines de jonctions serrées est en partie lié au réseau du cytosquelette d'actine [Spindler et Hsu, 2012; Stamatovic et al., 2008]. Nos observations en microscopie confocale indiquent sa destruction de manière concomitante avec la détection précoce de la protéine virale VP1, dès 4h d'infection pour des cellules infectées par E-30, E-12 ou EV-A69. Une étude réalisée avec des cellules épithéliales Caco-2 polarisées, montre une destruction similaire du réseau d'actine dès 4h d'infection par une souche d'E-11 [Sobo et al., 2012].

Un autre profil intra cellulaire commun, mais jamais rapporté pour un EV, est une relocalisation des mitochondries actives à proximité de la zone où se concentre le matériel vésiculaire (usine virale) issu de la réorganisation des membranes intra cytoplasmiques. Des profils sensiblement similaires ont été rapportés pour 2 virus à ADN : le virus de l'hépatite B et l'ASFV (African swine fever virus) [Kim et al., 2007 ; Castello et al., 2009 ; Rojo et al., 1998]. Le rôle de la relocalisation mitochondriale viro-induite n'est pas connu et ouvre différentes perspectives. Le regroupement des mitochondries à proximité de l'usine virale pourrait suggérer un couplage de la synthèse d'ATP avec la réplication virale, ou bien un mécanisme cellulaire de résistance au stress.

Enfin nos observations par microscopie électronique à transmission ont révélé pour la première fois, des éléments de l'ultrastructure de cellules endothéliales infectées par les géotypes E-30, E-6, E-12 et EV-A71. Nous retrouvons au sein de ces cellules le profil typique d'une infection par un picornavirus, caractérisé par le remodelage membranaire massif en multiples vésicules structurées. De subtiles différences ultrastructurales sont observées entre les géotypes testés. Les cellules infectées par les E-6, E-30 et E-12 présentent une nette dilatation du réticulum endoplasmique rugueux, des déformations caractéristiques du noyau plus ou moins marquées en fonction du géotype, ainsi qu'une fuite du matériel nucléaire à travers des perforations. Aucune de ces caractéristiques n'est observée dans les cellules infectées par l'EV- A71. Parallèlement, les

structures vésiculaires viro-induites ne présentent pas la même morphologie. Pour les E-6, E-30 et E-12, les vésicules à membrane simple ou double sont compactées dans un ou plusieurs ensembles évoquant une éponge. Ceux-ci sont regroupés vers le noyau pour les E-6 et E-30, et plutôt en périphérie de la cellule pour l'E-12. Des structures tubulaires présentant une invagination positive des membranes ont aussi été remarquées. Cette morphologie générale est en accord avec des travaux conduits sur l'ultrastructure de ces ensembles vésiculaires au sein de cellules infectées par le PV-1 et le CV-B3 [Belov et al., 2012; Limpens et al., 2011]. Les structures vésiculaires dans les cellules infectées par l'EV-A71 présentent un aspect clairement différent par leur structure multilamellaire et leur caractère extensif dans la cellule.

Une perspective à ces résultats serait d'identifier les mécanismes impliqués dans la formation des vésicules. Il a été proposé que l'autophagie soit un des effecteurs de cette réorganisation cytoplasmique. L'observation de vacuoles autophagiques et de nombreux autolysosomes de grande taille dans les cellules hCMEC/D3 infectées, est en accord avec cette hypothèse. Le marquage du facteur autophagique LC3-II permettrait de valider l'autophagie comme un mécanisme viro-induit dans les cellules hCMEC/D3 infectées par les EVs. L'induction d'un processus autophagique a été rapporté dans des cellules infectées par les PV-1, CV-B et EV-A71 [Xi et al., 2013; Richards et Jackson, 2012; Huang et al., 2009; Wong et al., 2008; Jackson et al., 2005]. Beaucoup d'interrogations demeurent sur son rôle précis, son déclenchement et son aboutissement. S'agit-il d'une réponse antivirale de la cellule pour éliminer du virus cytoplasmique ? Est-ce un processus détourné lors de l'infection pour recycler les composants cellulaires dans le cycle viral ? Ou les deux aspects sont-ils intriqués ? Ceci mériterait d'être étudié selon une stratégie de désarmement mutuel du virus et de la cellule comme cela a déjà été expérimenté pour la mortalité cellulaire viro-induite [Agol, 2012 ; Mikitas et al., 2012].

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse est le résultat de deux approches complémentaires : leur point commun est l'exploration des conséquences physiopathologiques de la diversité des EVs. La première approche, liée au diagnostic virologique, a permis d'établir un lien entre l'intensité de la charge virale et le génotype des souches, donc de relier un processus physiopathologique *in vivo* à la diversité des EV. Dans la seconde approche, nous avons exploré les conséquences de la diversité avec un modèle expérimental, avec l'idée générale cependant que des modalités communes devaient être en cause lors de l'infection du SNC.

La caractérisation des génomes viraux par le séquençage (type Sanger) et l'étude des populations virales par les techniques de reconstruction phylogénétique sont utilisées dans le laboratoire pour décrire de façon précise la diversité des souches d'EVs. Ces techniques ont permis de décrire la multitude de variants qui existe à l'échelle infra génotypique par exemple pour l'EV-71, l'E-30 et le CV-B5. Ces variants circulent parmi les populations de patients, dans les communautés, et nécessairement dans la population générale. La transmission de ces variants montrée par les phylogénies ne renseigne pas pour autant sur les conséquences physiopathologiques de cette diversité. Pour appréhender ces aspects, il est nécessaire de recourir à des modèles biologiques simples à mettre en œuvre et pertinents sur le plan biologique des relations virus/hôte. Les modèles animaux non primates d'infections à EV sont peu nombreux et pas toujours pertinents en termes de physiopathologie humaine, et les modèles animaux « humanisés » restent des exceptions. Nous nous sommes donc tournés vers des modèles cellulaires tridimensionnels dans la perspective future d'analyser l'éventail des interactions mises en jeu dans le processus de franchissement des barrières endothéliales microvasculaires par les EVs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbott, N. J., Rönnbäck, L., Hansson, E. 2006.** Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 7(1):41-53.
2. **Abzug, M. J. 2013.** The enteroviruses: Problems in need of treatments. *The Journal of Infection*. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.020. [Epub ahead of print]
3. **Afonso, P. V., Ozden, S., Cumont, M. C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A., Couraud, P. O., Pique, C., Ceccaldi, P. E., Romero, I. A. 2008.** Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathogens*. 4(11).
4. **Agol, V.I. 2012.** Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends Microbiol*. 20(12):570-6.
5. **Agol, V. I., Belov, G. A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M. S., Romanova, L. I., Sladkova, L. V., Tolskaya, E. A. 2000.** Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *Journal of Virology*. 74(12): 5534-41.
6. **Aguzzi, A., Barres, B. A., Bennett, M. L. 2013.** Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*. 339(6116):156-161.
7. **Al Ahmad, A., Gassmann, M., Ogunshola, O. O. 2009.** Maintaining blood-brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J Cell Physiol*. 18(3):612-622.
8. **Alexander, A. D., Dimock, K. 2002.** Sialic Acid Functions in Enterovirus 70 Binding and Infection. *Journal of Virology*. 76(22):11265-72.
9. **Alvarez, J. I., Katayama, T., Prat, A. 2013.** Glial Influence on the Blood Brain Barrier. *Glia*. **Online version.** DOI: 10.1002/glia.22575.
10. **Archimbaud, C., Ouchchane, L., Mirand, A., Chambon, M., Demeocq, F., Labbé, A., Laurichesse, H., Schmidt, J., Clavelou, P., Aumaitre, O., Regagnon, C., Bailly, J. L., Henquell, C., Peigue-Lafeuille, H. 2013.** Improvement of the management of infants, children and adults with a molecular diagnosis of Enterovirus meningitis during two observational study periods. *PLoS One*. 8(7):e68571.
11. **Archimbaud, C., Mirand, A., Chambon, M., Regagnon, C., Bailly, J.L., Peigue-Lafeuille, H., Henquell, C., 2004.** Improved diagnosis on a daily basis of Enterovirus meningitis using a one step real-time RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 74(4): 604-611.
12. **Archimbaud, C., Bailly, J. L., Chambon, M., Tournilhac, O., Travade, P., Peigue Lafeuille, H. 2003.** Molecular evidence of persistent echovirus 13 meningoencephalitis in a patient with relapsed lymphoma after an outbreak of meningitis in 2000. *J Clin Microbiol*. 41(10):4605-10.
13. **Bailly, J. L., Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Regagnon, C., Charbonné, F., Peigue-Lafeuille, H. 2011.** Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*. 11(2):276-89.
14. **Bailly, J. L., Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonné, F., Traoré, O., Peigue-Lafeuille, H. 2009.** Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(4):699-708.
15. **Bailly, J. L., Béguet, A., Chambon, M., Henquell, C., Peigue-Lafeuille, H. 2000a.** Nosocomial transmission of echovirus 30: molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(8):2889-92.

16. **Bailly, J.L., Chambon, M., Henquell, C., Icart, J., Peigue-Lafeuille, H. 2000b.** Genomic variations in echovirus 30 persistent isolates recovered from a chronically infected immunodeficient child and comparison with the reference strain. *J Clin Microbiol.* 38(2):552-7.
17. **Banerjee, R., Weidman, M. K., Navarro, S., Comai, L., Dasgupta, A. 2005.** Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *Journal of General Virology.* 86(8) :2315–2322.
18. **Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J., Hogle, J. M. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Science.* 3(10):1651-69.
19. **Belnap, D. M., McDermott JR, B. M., Filman, D. J., Cheng, N., Trus, B. L., Zuccola, H. J., Racaniello, V. R., Hogle, J. M., Steven, A. C. 1999.** Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *PNAS.* 97(1):73–78.
20. **Belov, G. A., Nair, V., Hansen, B. T., Hoyt, F. H., Fischer, E. R., Ehrenfeld, E. 2012.** Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *Journal of Virology.* 86(1):302-12.
21. **Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J., Ehrenfeld, E. 2007.** Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *Journal of Virology.* 81(2):558–567.
22. **Belov, G. A., Romanova, L. I., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Lazebnik, Y. A., Agol, V. I. 2003.** The major apoptotic pathway activated and suppressed by poliovirus. *Journal of Virology.* 77(1): 45-56.
23. **Bencurova, E., Mlynarcik, P., Bhide, M. 2011.** An insight into the ligand-receptor interactions involved in the translocation of pathogens across blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 63(3):297-318.
24. **Bergelson, J. M., St John, N., Kawaguchi, S., Chan, M., Stubbald, H., Modlin, J., Finberg, R. W. 1993.** Infection by Echoviruses 1 and 8 Depends on the cx2 Subunit of Human VLA-2. *Journal of Virology.* 67(11):6847–52.
25. **Bergelson, J. M., Chan, M., Solomon, K. R., St John, N. F., Lin, H., Finberg, R. W. 1995.** Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *PNAS.* 91(13):6245-48.
26. **Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., Finberg, R. W. 1997.** Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science.* 275(5304):1320-3.
27. **Bergers, G., Song, S. 2005.** The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology.* 7(4):452-64.
28. **Bernas, M. J., Cardoso, F. L., Daley, S. K., Weinand, M. E., Campos, A. R., Ferreira, A. J., Hoying, J. B., Witte, M. H., Brites, D., Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Brito, M. A. 2010.** Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nature Protocols.* 5(7):1265-72.
29. **Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M. 1992.** Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *Journal of Virology.* 66(5):2740-7.
30. **Bienz, K., Egger, D., Wolff, D. A. 1973.** Virus replication, cytopathology, and lysosomal enzyme response of mitotic and interphase Hep-2 cells infected with poliovirus. *Journal of Virology.* 11(4):565-74.
31. **Bodian, D. 1955.** Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science.* 122(3159):105-8.
32. **Bozym, R. A., Patel, K., White, C., Cheung, K. H., Bergelson, J. M., Morosky, S. A., Coyne, C. B. 2011.** Calcium signals and calpain-dependent necrosis are essential for release of coxsackievirus B from polarized intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell.* 22(17): 3010-21.

33. **Bozym RA, Morosky SA, Kim KS, Cherry S, Coyne CB. 2010.** Release of intracellular calcium stores facilitates coxsackievirus entry into polarized endothelial cells. *PLoS Pathog.* 6(10).
34. **Brown, B. A., Pallansch, M. A. 1995.** Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Research.* 39(2-3):195-205.
35. **Cardoso, F. L., Brites, D., Brito, M. A. 2010.** Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Review.* 64(2):328-63.
36. **Carman, C. V., Springer, T. A. 2008.** Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Current Opinion in Cell Biology.* 20(5):533-40.
37. **Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M., Springer, T. A. 2007.** Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 26(6):784-97.
38. **Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F., Crainic, R. 2001.** Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *Journal of General Virology.* 82(1):79-91.
39. **Castelló, A., Quintas, A., Sánchez, E.G., Sabina, P., Nogal, M., Carrasco, L., Revilla, Y. 2009.** Regulation of host translational machinery by African swine fever virus. *PLoS Pathog.* 2009 Aug;5(8):e1000562.
40. **Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., Fenart, L. 2007.** Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery.* 6(8):650-61.
41. **Chadwick, D. R. 2006.** Viral meningitis. *British Medical Bulletin.* 75-76:1-14.
42. **Chambon, M., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Gourgand, J. M., Charbonné, F., Peigue-Lafeuille, H. 2004.** Virucidal Efficacy of Glutaraldehyde against Enteroviruses is Related to the Location of Lysine Residues in Exposed Structures of the VP1 Capsid Protein. *Applied and Environmental Microbiology.* 70(3):1717-1722.
43. **Chambon, M., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Henquell, C., Regagnon, C., Charbonné, F., Peigue-Lafeuille, H. 2001.** Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *Journal of Medical Virology.* 65(2):340-7.
44. **Chen K. T., Chang H. L., Wang S. T., Cheng Y. T., Yang J. Y. 2007a.** Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics.* 120(2):e244-52.
45. **Chen, C. S., Yao, Y. C., Lin, S. C., Lee, Y. P., Wang, Y. F., Wang, J. R., Liu, C. C., Lei, H. Y., Yu, C. K. 2007b.** Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *Journal of Virology.* 81(17):8996-9003.
46. **Civardi, E., Tzialla, C., Baldanti, F., Strocchio, L., Manzoni, P., Stronati, M. 2013.** Viral outbreaks in neonatal intensive care units: What we do not know. *American Journal of Infection Control.* 41(10):854-6.
47. **Clark, M. E., Thomas Hammerle, T., Wimmer, E., Dasgupta, A. 1991.** Poliovirus proteinase 3C converts an active form of transcription factor IIIC to an inactive form: a mechanism for inhibition of host cell polymerase III transcription by poliovirus. *The EMBO Journal.* 10(10):2941 -2947.
48. **Clark, M. E., Lieberman, P. M., Berk, A. J., Dasgupta, A. 1993.** Direct Cleavage of Human TATA-Binding Protein by Poliovirus Protease 3C In Vivo and In Vitro. *Molecular and Cellular Biology.* 13(2):1232-1237.
49. **Colunno, R. J., Callahan, P. L., Long, W. J. 1986.** Isolation of a Monoclonal Antibody That Blocks Attachment of the Major Group of Human Rhinoviruses. *Journal of Virology.* 57(1):7-12.
50. **Combes, V., Guillemin, G. J., Chan-Ling, T., Hunt, N. H., Grau, G. E. 2012.** The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends in Parasitology.* 28(8):311-9.
51. **Committee on the enteroviruses, National Foundation For Infantile Paralysis. 1957.** *American Journal of public health.* 47(12):1556-66.

52. **Conaldi, P. G., Serra, C., Mossa, A., Falcone, V., Basolo, F., Camussi, G., Dolei, A., Toniolo, A. 1997.** Persistent infection of human vascular endothelial cells by group B coxsackieviruses. *The Journal of Infectious Disease*. 175(3):693-6.
53. **Cornell, C. T., Kiosses, W. B., Stephanie Harkins, S., Whitton, J. L. 2006.** Inhibition of Protein Trafficking by Coxsackievirus B3: Multiple Viral Proteins Target a Single Organelle. *Journal of Virology*. 80(13): 6637–6647.
54. **Coyne, C. B., Bozym, R., Morosky, S. A., Hanna, S. L., Mukherjee, A., Tudor, M., Kim, K. S., Cherry, S. 2011.** Comparative RNAi Screening Reveals Host Factors Involved in Enterovirus Infection of Polarized Endothelial Monolayers. *Cell Host Microbe*. 9(1):70-82.
55. **Coyne, C. B., Kim, K. S., Bergelson, J. M. 2007.** Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *EMBO J*. 26(17):4016-28.
56. **Coyne, C. B., Bergelson, J. M. 2006.** Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 124(1):119-31.
57. **Cucullo, L., Couraud, P. O., Weksler, B., Romero, I. A., Hossain, M., Rapp, E., Janigro, D. 2008.** Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*. 28(2):312-28.
58. **de Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U. A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Bates, E. E., Caux, C. 2005.** Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(46): 38133-45.
59. **De Jong, A. S., De Mattia, F., Van Dommelen, M.M., Lanke, K., Melchers, W.J., Willems, P.H., Van Kuppeveld, F.J. 2008.** Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *Journal of Virology*. 82(7):3782-3790.
60. **Dierssen, U., Rehren, F., Henke-Gendo, C., Harste, G., Heim, A., 2008.** Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology*. 42(1):58-64.
61. **Dittmar, S., Harms, H., Runkler, N., Maisner, A., Kim, K. S., Schneider-Schaulies, J. 2008.** Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *Journal of Virology*. 82(22):11273-82.
62. **Dobbie, M. S., Hurst, R. D., Klein, N. J., Surtees, R. A. 1999.** Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour necrosis factor- α in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Research*. 830(2):330-6.
63. **Doedens, J. R., Kirkegaard, K. 1995.** Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *The EMBO journal*. 14(5):894-907.
64. **Doedens, J. R., Giddings, T, H., Kirkegaard, K. 1996.** Inhibition of Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Traffic by Poliovirus Protein 3A: Genetic and Ultrastructural Analysis. *Journal of Virology*. 71(12):9054–9064.
65. **Dunnebacke, T. H., Levinthal, J. D., Williams, R. C. 1969.** Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells. *Journal of Virology*. 4(4):505-13.
66. **Egger, D., Bienz, K. 2005.** Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *Journal of General Virology*. 86(Pt 3):707-18.
67. **Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., Bienz, K. 2000.** Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *Journal of Virology*. 74(14):6570-80.
68. **Engelhardt, B., Coisne, C. 2011.** Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids and Barriers of the CNS*. 8(1):4.
69. **Fuhrman, J. A., Liang, X., Noble, R. T. 2005.** Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8):4523-30.

70. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cellular Biology*. 123(6 Pt 2):1777-88.
71. Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of Cellular Biology*. 127(6 Pt 1):1617-26.
72. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cellular Biology*. 141(7):1539-50.
73. Gamarnik, A.V., Andino, R. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & Development*. 12(15):2293-2304.
74. Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, Fenart L. 2008. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Research*. 1249:34-42.
75. Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H., Sonenberg, N. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *PNAS*. 95(19):11089-94.
76. Heikkilä, O., Susi, P., Stanway, G., Hyypiä, T. 2009. Integrin α V β 6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *Journal of General Virology*. 90(Pt 1):197-204.
77. Hamm, S., Dehouck, B., Kraus, J., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Risau, W., Cecchelli, R., Engelhardt, B., Dehouck, M. P. 2004. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell and Tissue Research*. 315(2):157-166.
78. Han, T.H., Chung, J.Y., You, S.J., Youn, J.L., Shim, G.h. 2013. Human parechovirus-3 infection in children, South Korea. *Journal of Clinical Virology*. 58(1):194-9.
79. Harris, K. G., Coyne, C. B. 2013. Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine*. 63(3):230-6.
80. Hasebe, R., Suzuki, T., Makino, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., Kimura, T. 2010. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiology*. 10:165.
81. Hatherell, K., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B., Pilkington, G. J. 2011. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *Journal of Neuroscience Methods*. 199(2):223-229.
82. Hedrick, S. M., Ch'en, I. L., Alves, B. N. 2010. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunological Reviews*. 236: 41-53.
83. Herold, J., Andino, R. 2001. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein-Protein Bridge. *Molecular Cell*. 7(3):581-591.
84. Hogle, J. M. 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual Review of Microbiology*. 56: 677-702.
85. Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C. E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F. J., Altan-Bonnet, N. 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*. 141(5):799-811.
86. Huang, S. C., Chang, C. L., Wang, P. S., Tsai, Y., Liu, H. S. 2009. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J Med Virol*. 81(7): 1241-52.

87. **Huang, W., Eum, S. Y., András, I. E., Hennig, B., Toborek, M. 2008.** PPARalpha and PPARgamma attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities. *FASEB J.* 23(5):1596-606.
88. **Huber, S. A., Haisch, C., Lodge, P. A. 1990.** Functional diversity in vascular endothelial cells: role in coxsackievirus tropism. *Journal of Virology.* 64(9):4516-22.
89. **Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S. 1999.** Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cellular Biology.* 147(6):1351-63.
90. **Jacobson, M. F., Baltimore, D. 1968.** Morphogenesis of poliovirus I Association of the viral RNA with coat protein. *Journal of Molecular Biology.* 33(2): 369-78.
91. **Jackson, W. T., Giddings, T. H. Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., Kirkegaard, K. 2005.** Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biology.* 3(5): e156.
92. **Jacques, J., Moret, H., Minette, D., Lévêque, N., Jovenin, N., Deslée, G., Lebargy, F., Motte, J., Andréoletti, L. 2008.** Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *Journal of Clinical Microbiology.* 46(1):206-13.
93. **Jambou, R., Combes, V., Jambou, M. J., Weksler, B. B., Couraud, P. O., Grau, G. E. 2010.** Plasmodium falciparum adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. *PLoS Pathog.* 2010 Jul 29;6(7).
94. **Joffret, M. L., Jégouic, S., Bessaud, M., Balanant, J., Tran, C., Caro, V., Holmblat, B., Razafindratsimandresy, R., Reynes, J. M., Rakoto-Andrianarivelo, M., Delpeyroux, F. 2012.** Common and diverse features of cocirculating type 2 and 3 recombinant vaccine-derived polioviruses isolated from patients with poliomyelitis and healthy children. *The Journal of Infectious Disease.* 205(9):1363-73.
95. **Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O., Sarnow, P. 1999.** Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *PNAS.* 96(23):13118-13123.
96. **Jordan, T. X., Randall, G. 2012.** Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes and Infection.* 14(2): 126-39.
97. **Jurgens, C. K., Barton, D. J., Sharma, N., Morasco, B. J., Ogram, S. A., Flanagan, J. B. 2006.** 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology.* 345(2):346-357.
98. **Kawashima, H., Ioi, H., Ishii, C., Hasegawa, Y., Amaha, M., Kashiwagi, Y., Takekuma, K., Hoshika, A., Watanabe, Y. 2008.** Viral loads of cerebrospinal fluid in infants with enterovirus meningitis. *J Clin Lab Anal.* 22(3):216-9.
99. **Kempf, B. J., Barton, D. J. 2008a.** Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *Journal of Virology.* 82(12):5847-5859.
100. **Kempf, B. J., Barton, D. J. 2008b.** Poly(rC) Binding Proteins and the 5' Cloverleaf of Uncapped Poliovirus mRNA Function during De Novo Assembly of Polysomes. *Journal of Virology.* 82(12):5835-5846.
101. **Kestenbaum, L.A., Ebberson, J., Zorc, J.J., Hodinka, R.L., Shah, S.S. 2010.** Defining cerebrospinal fluid white blood cell count reference values in neonates and young infants. *Pediatrics.* 125:257-64.
102. **Khetsuriani, N., Lamonte, A., Oberste, M. S., Pallansch, M. 2006.** Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 25(10):889-93.
103. **Kim, S., Kim, H.Y., Lee, S., Kim, S.W., Sohn, S., Kim, K., Cho, H. 2007.** Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners. *Journal of Virology.* 81(4):1714-26.

104. **Kirkpatrick, C. J., Bültmann, B. D., Gruler, H. 1984.** Interaction between enteroviruses and human endothelial cells in vitro. Alterations in the physical properties of endothelial cell plasma membrane and adhesion of human granulocytes. *The American Journal of Pathology*. 118(1):15-25.
105. **Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., Emini, E. A., Hanecak, R., Lee, J. L., Van der Werf, S., Anderson, C. W., Wimmer, E. 1981.** Primary structure, gene organization, and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 291(5816):547-553.
106. **Kivisäkk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L., Baekkevold, E.S., Lassmann, H., Staugaitis, S.M., Campbell, J.J., Ransohoff, R.M. 2003.** Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(14):8389-94.
107. **Koike, S., Ise, I., Nomoto, A. 1991.** Functional domains of the poliovirus receptor. *PNAS*. 88(10):4104-8.
108. **Kung, C.M., King, C.C., Lee, C.N., Huang, L.M., Lee, P.I., Kao, C.L. 2007.** Differences in replication capacity between enterovirus 71 isolates obtained from patients with encephalitis and those obtained from patients with herpangina in Taiwan. *Journal of Medical Virology*. 79(1):60-8.
109. **Lamkanfi, M., Dixit, V. M. 2010.** Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host & Microbe*. 8(1):44-54.
110. **Lancaster, K. Z., Pfeiffer, J. K. 2010.** Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathogens*. 6(3):e1000791.
111. **Lei, X., Sun, Z., Liu, X., Jin, Q., He, B., Wang, J. 2011.** Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll like receptor 3. *Journal of Virology*. 85(17): 8811-8.
112. **Lerner, R. S., Nicchitta, C. V. 2006.** mRNA translation is compartmentalized to the endoplasmic reticulum following physiological inhibition of cap-dependent translation. *RNA*. 12(5):775-789.
113. **Lévêque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P., Andréoletti, L. 2012.** Quantitative genomic and antigenomic enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Microbiol*. 50(10):3378-80.
114. **Liang, C. C., Sun, M. J., Lei, H. Y., Chen, S. H., Yu, C. K., Liu, C. C., Wang, J. R., Yeh, T. M. 2004.** Human endothelial cell activation and apoptosis induced by enterovirus 71 infection. *Journal of Medical Virology*. 74(4):597-603.
115. **Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., Wolburg, H. 2000.** Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathologica*. 100:323–31.
116. **Lim, K. A., Benyesh-Melnick, M. 1960.** Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of Enteroviruses (Coxsackie and ECHO). *J Immunol*. 84:309-317.
117. **Limpens, R. W., van der Schaar, H. M., Kumar, D., Koster, A.J., Snijder, E. J., van Kuppeveld, F. J., Bárcena, M. 2011.** The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio*. 2(5).
118. **Lindberg, A. M., Stålhandske, P. O., Pettersson, U. 1987.** Genome of coxsackievirus B3. *Virology*. 156(1):50-63.
119. **Liu, N.Q., Lossinsky, A.S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M., Fiala, M. 2002.** Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Virology*. 76(13):6689-700.
120. **McCall, K. 2010.** Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*. 22(6):882-8.

121. **MacGregor, R. R., Friedman, H. M., Macarak, E. J., Kefalides, N. A. 1980.** Virus infection of endothelial cells increases granulocyte adherence. *The Journal of Clinical Investigation*. 65(6):1469-77.
122. **Matteucci, D., Paglianti, M., Giangregorio, A.M., Capobianchi, M.R., Dianzani, F., Bendinelli, M. 1985.** Group B coxsackieviruses readily establish persistent infections in human lymphoid cell lines. *Journal of Virology*. 56(2):651-4.
123. **Melnick, L. J. 1996.** My role in the discovery and classification of Enteroviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:1–24.
124. **Mena, I., Perry, C.M., Harkins, S., Rodriguez, F., Gebhard, J., Whitton, J.L. 1999.** The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol.* 155(4):1205-15.
125. **Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., Racaniello, V. R. 1989.** Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* 56(5):855-65.
126. **Mikitas, O.V., Ivin, Y.Y., Golyshev, S.A., Povarova, N.V., Galkina, S.I., Pletjushkina, O.Y., Nadezhdina, E.S., Gmyl, A.P., Agol, V.I. 2012.** Suppression of injuries caused by a lytic RNA virus (mengovirus) and their uncoupling from viral reproduction by mutual cell/virus disarmament. *Journal of Virology*. 86(10):5574-83.
127. **Miller, S., Krijnse-Locker, J. 2008.** Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology*. 6(5):363-74.
128. **Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonne, F., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J.L. 2008.** Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:87-96.
129. **Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J. L. 2007.** Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *The Journal of General Virology*. 88(1):166-76.
130. **Mirand, A., Archimbaud, C., Henquell, C., Michel, Y., Chambon, M., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J. L. 2006.** Prospective Identification of HEV-B Enteroviruses During the 2005 Outbreak. *Journal of Medical Virology*. 78(12):1624–1634.
131. **Mistry, N., Inoue, H., Jamshidi, F., Storm, R.J., Oberste, M.S., Arnberg, N. 2011.** Coxsackievirus A24 variant uses sialic acid-containing O-linked glycoconjugates as cellular receptors on human ocular cells. *Journal of Virology*. 85(21):11283-90.
132. **Monpoeho, S., Coste-Burel, M., Costa-Mattioli, M., Besse, B., Chomel, J.J., Billaudel, S., Ferré, V., 2002.** Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21(7):532-536.
133. **Mukherjee, A., Morosky, S. A., Delorme-Axford, E., Dybdahl-Sissoko, N., Oberste, M. S., Wang, T., Coyne, C. B. 2011.** The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathogens*. 7(3): e1001311.
134. **Nagy, Z., Peters, H., Huttner, I. 1984.** Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 50(3): 313-322.
135. **Naze, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., Zeller, H., Staikowsky, F., Grivard, P., Michault, A., Laurent, P., 2009.** Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *Journal of virological methods*:162(1-2), 1-7.
136. **Newcombe, N. G., Andersson, P., Johansson, E. S., Au, G. G., Lindberg, A. M., Barry, R. D., Shafren, D. R. 2003.** Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *Journal of General Virology*. 84(11):3041-50.
137. **Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V. I., Gudkov, A. V. 2001.** Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *Journal of Virology*. 75(21): 10409-20.

138. Negishi, H., Osawa, T., Ogami, K., Ouyang, X., Sakaguchi, S., Koshiba, R., Yanai, H., Seko, Y., Shitara, H., Bishop, K., Yonekawa, H., Tamura, T., Kaisho, T., Taya, C., Taniguchi, T., Honda, K. 2008. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *PNAS*. 105(51):20446-51.
139. Nishimura, Y., Wakita, T., Shimizu, H. 2010. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathogens*. 6(11):e1001174.
140. Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Shimizu, H. 2009. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nature Medecine*. 15(7):794-7.
141. Novak, J. E., Kirkegaard, K. 1991. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *Journal of Virology*. 65(6): 3384-7.
142. Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P., Kirkegaard, K. 1999. Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *Journal of virology*. 73(1):427-35.
143. Obermeier, B., Daneman, R., Ransohoff, R. M., 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medecine*. 19(12):1584-96.
144. Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, B. A., Pallansch, M. A. 1999. Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(5): 1288–1293.
145. Ohka, S., Igarashi, H., Nagata, N., Sakai, M., Koike, S., Nochi, T., Kiyono, H., Nomoto, A. 2007. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *Journal of Virology*. 81(15):7902-12.
146. Ohka, S., Matsuda, N., Tohyama, K., Oda, T., Morikawa, M., Kuge, S., Nomoto, A. 2004. Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J Virol*. 78(13):7186-98.
147. Ohka, S., Yang, W. X., Terada, E., Iwasaki, K., Nomoto, A. 1998. Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology*. 250(1):67-75.
148. Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V. M., Morley, S. J. 1996. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *The EMBO Journal*. 15(6):1371-1382.
149. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurology*. 1(5):409-417.
150. Oresković, D., Klarica, M. 2010. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews*. 64(2):241-62.
151. Ostermann, G., Weber, K. S., Zerneck, A., Schröder, A., Weber, C. 2002. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immunology*. 3(2):151-8.
152. Palmenberg, A. C. 1982. In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *Journal of Virology*. 44(3): 900-6.
153. Peigue-Lafeuille, H., Croquez, N., Laurichesse, H., Clavelou, P., Aumaitre, O., Schmidt, J., Maillet-Vioud, M., Henquell, C., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Chambon, M. 2002. Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *Journal of Medical Virology*. 67(1):47-53.
154. Pelletier, J., Sonenberg, N. 1989. Internal Binding of Eucaryotic Ribosomes on Poliovirus RNA: Translation in HeLa Cell Extracts. *Journal of Virology*. 63(1):441-444.
155. Persidsky, Y., Poluektova, L. 2006. Immune privilege and HIV-1 persistence in the CNS. *Immunological Reviews*. 213:180-94.

156. **Pilipenko, E. V., Maslova, S. V., Sinyakov, A. N., Agol, V. I. 1992.** Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Research*. 20(7):1739-1745.
157. **Pilipenko, E. V., Poperechny, K. V., Maslova, S. V., Melchers, W. J., Slot, H. J., Agol, V. I. 1996.** Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *The EMBO Journal*. 15(19):5428-5436.
158. **Plevka, P., Hafenstein, S., Harris, K. G., Cifuentes, J. O., Zhang, Y., Bowman, V. D., Chipman, P. R., Bator, C. M., Lin, F., Medof, M. E., Rossmann, M. G. 2010.** Interaction of Decay-Accelerating Factor with Echovirus 7. *Journal of Virology*. 84(24):12665–74.
159. **Plevka, P., Perera, R., Cardoso, J., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. 2012.** Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Science*. 336(6086):1274.
160. **Powell RM, Schmitt V, Ward T, Goodfellow I, Evans DJ, Almond JW. 1998.** Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *Journal of General Virology*. 79(7):1707–1713.
161. **Racaniello, V.R. 2006.** Picornaviridae : The viruses and their replication. In Lippincott, W & W., Diane, Griffin, D.E., Howley, P.M., Lamb, R.A., Malcolm, M.A. ed *Fields Virology* 5th edition. Vol 1. LWW.
162. **Reese, T. S., Karnovsky, M. J. 1967.** Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of Cell Biology*. 34(1):207-217.
163. **Reiber, H. 2003.** Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci*. 21(3-4):79-96.
164. **Ren, R., Racaniello, V. R. 1992.** Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *The Journal of Infectious Diseases*. 166(4):747-52.
165. **Richards, A. L., Jackson, W. T. 2012.** Intracellular vesicle acidification promotes maturation of infectious poliovirus particles. *PLoS Pathogens*. 8(11):e1003046.
166. **Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M.L., Viñuela, E., Cuezva, J.M., Salas, J. 1998.** Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *Journal of Virology*. 72(9):7583-8.
167. **Romanova, L. I., Belov, G. A., Lidsky, P. V., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Evstafieva, A. G., Vartapetian, A. B., Egger, D., Bienz, K., Agol, V. I. 2005.** Variability in apoptotic response to poliovirus infection. *Virology*. 331(2):292-306.
168. **Rotbart, H. A. 1990.** Enzymatic RNA Amplification of the Enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3):438-442.
169. **Sabiiti, W., May, R. C. 2012.** Capsule Independent Uptake of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* into Brain Microvascular Endothelial Cells. *PLoS One*. 2012;7(4).
170. **Sabin, A. B. 1956.** Pathogenesis of poliomyelitis; reappraisal in the light of new data. *Science*. 123(3209):1151-7.
171. **Saijets, S., Ylipaasto, P., Vaarala, O., Hovi, T., Roivainen, M. 2003.** Enterovirus infection and activation of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Medical Virology*. 70(3):430-9.
172. **Sakka, L., Coll, G., Chazal, J. 2011.** Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 128(6):309-16.
173. **Sato, M., Hosoya, M., Honzumi, K., Watanabe, M., Ninomiya, N., Shigeta, S., Suzuki, H. 2003.** Cytokine and cellular inflammatory sequence in enteroviral meningitis. *Pediatrics*. 112:1103-7.
174. **Schlegel, A., Giddings, T. H. Jr., Ladinsky, M. S., Kirkegaard, K. 1996.** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *Journal of Virology*. 70(10):6576-88.

175. Shafren, D. R., Bates, R. C., Agrez, M. V., Herd, R. L., Burns, G. F., Barry, R. D. 1995. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 Use Decay Accelerating Factor as a Receptor for Cell Attachment. *Journal of Virology*. 69(6):3873–3877.
176. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD. 1997. Coxsackievirus A21 Binds to Decay-Accelerating Factor but Requires Intercellular Adhesion Molecule 1 for Cell Entry. *Journal of Virology*. 84(11): 3041-50.
177. Shieh, J. T., Bergelson, J. M. 2002. J Virol. 2002 Sep;76(18):9474-80. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*. 76(18):8953–8965.
178. Smura, T., Ylipaasto, P., Klemola, P., Kaijalainen, S., Kyllönen, L., Sordi, V., Piemonti, L., Roivainen, M.. 2010. Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro: implications for pathogenesis. *Journal of Medical Virology*. 82(11):1940-9.
179. Sobo, K., Stuart, A.D., Rubbia-Brandt, L., Brown, T.D., McKee, T.A. 2012. Echovirus 11 infection induces dramatic changes in the actin cytoskeleton of polarized Caco-2 cells. *Journal of General Virology*. 93(3):475-87.
180. Spindler, K. R., Hsu, T. H. 2012. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology*. 20(6):282-90.
181. Stamatovic, S. M., Sladojevic, N., Keep, R. F., Andjelkovic, A. V. 2012. Relocalization of junctional adhesion molecule A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology*. 32(17):3414-27.
182. Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Andjelkovic, A. V. 2008. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology*. 6(3). 179-192.
183. Stins, M. F., Badger, J., Sik Kim, K. 2001. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 30(1):19-28.
184. Suhy, D. A., Giddings, T. H., Kirkegaard, K. 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *Journal of Virology*. 74(19): 8953–8965.
185. Taylor, M. P., Koyuncu, O. O., Enquist, L. W. 2012. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology*. 9(6):427-39.
186. van Kuppeveld, F. J., Hoenderop, J. G., Smeets, R. L., Willems, P. H., Dijkman, H. B., Galama, J. M., Melchers, W. J. 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO Journal*. 16(12): 3519-32.
187. Venkatesan, A., Tunkel, A. R., Bloch, K. C., Luring, A. S., Sejvar, J., Bitnun, A., Stahl, J. P., Mailles, A., Drebot, M., Rupprecht, C. E., Yoder, J., Cope, J. R., Wilson, M.R., Whitley, R. J., Sullivan, J., Granerod, J., Jones, C., Eastwood, K., Ward, K. N., Durrheim, D. N., Solbrig, M. V., Guo-Dong, L., Glaser, C. A; International Encephalitis Consortium. 2013. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clinical Infectious Diseases*. 57(8):1114-28.
188. Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo, H., Nakatsuka, A., Nerurkar, V. R. 2009. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*. 385(2):425-33.
189. Vogt, D. A., Andino, R. 2010. An RNA Element at the 5'-End of the Poliovirus Genome Functions as a General Promoter for RNA Synthesis. *PLoS Pathogens*. 6(6).
190. Wakim, L.M., Woodward-Davis, A., Bevan, M. J. 2010. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *PNAS*. 107(42): 872-879.
191. Wang, B., Xi, X., Lei, X., Zhang, X., Cui, S., Wang, J., Jin, Q., Zhao, Z. 2013. Enterovirus 71 protease 2Apro targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. *PLoS Pathogens*. 9(3):e1003231.

192. Wang, J. P., Cerny, A., Asher, D. R., Kurt-Jones, E. A., Bronson, R. T., Finberg, R. W. 2010. MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus. *Journal of Virology*. 84(1):254-60.
193. Ward, T., Pipkin, P. A., Clarkson, N. A., Stone, D. M., Minor, P. D., Almond, J. W. 1994. Decay accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO Journal*. 13(21):5070-4.
194. Ward, C. D., Stokes, M. A., Flanagan, J. B. 1988. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *Journal of Virology*. 62(2):558-62.
195. Weidman, M. K., Yalamanchili, P., Bryant, Ng., Tsai, W., Dasgupta, A. 2001. Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology*. 291(2):260-271.
196. Weksler, B., Romero, I. A., Couraud, P. O. 2013. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*. 10(1):16.
197. Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., Couraud, P. O. 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB Journal*. 19(13):1872-4.
198. Williams, K., Alvarez, X., Lackner, A. A. 2001. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*. 36(2):156-164.
199. Wolburg, H., Lippoldt, A. 2002. Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* 38(6): 323– 337.
200. Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., Luo, H. 2008. Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *Journal of Virology*. 82(18):9143-53.
201. Xi, X., Zhang, X., Wang, B., Wang, T., Wang, J., Huang, H., Wang, J., Jin, Q., Zhao, Z. 2013. The interplays between autophagy and apoptosis induced by enterovirus 71. *PLoS One*. 8(2):e56966.
202. Xiao, C., Bator-Kelly, C. M., Rieder, E., Chipman, P. R., Craig, A., Kuhn, R. J., Wimmer, E., Rossmann, M. G. 2005. The Crystal Structure of Coxsackievirus A21 and Its Interaction with ICAM-1. *Structure*. 13(7):1019–1033.
203. Yadav, A., Collman, R. G. 2009. CNS inflammation and macrophage/microglial biology associated with HIV-1 infection. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 4(4):430-47.
204. Yalamanchili, P., Weidman, K., Dasgupta, A. 1997. Cleavage of transcriptional activator Oct-1 by poliovirus encoded protease 3Cpro. *Virology*. 239(1):176-85.
205. Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T., Nagai, Y., Fujii, K., Koike, S. 2012. Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. *Journal of Virology*. 86(10):5686-96.
206. Yamayoshi, S., Ohka, S., Fujii, K., Koike, S. 2013. Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71. *Journal of Virology*. 86(6):3335-47.
207. Yang, W. X., Terasaki, T., Shiroki, K., Ohka, S., Aoki, J., Tanabe, S., Nomura, T., Terada, E., Sugiyama, Y., Nomoto, A. 1997. Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology*. 229(2):421-8.
208. Ylipaasto, P., Eskelinen, M., Salmela, K., Hovi, T., Roivainen, M. 2010. Vitronectin receptors, α_v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *Journal of General Virology*. 91(1):155-65.
209. Zhang, X., Zheng, Z., Shu, B., Liu, X., Zhang, Z., Liu, Y., Bai, B., Hu, Q., Mao, P., Wang, H. 2013. Human astrocytic cells support persistent coxsackievirus B3 infection. *Journal of Virology*. 87(22):12407-21.

- 210. Zanone, M. M., Favaro, E., Ferioli, E., Huang, G. C., Klein, N. J., Perin, P. C., Peakman, M., Conaldi, P. G., Camussi, G. 2007.** Human pancreatic islet endothelial cells express coxsackievirus and adenovirus receptor and are activated by coxsackie B virus infection. *FASEB Journal*. 21(12):3308-17.
- 211. Zanone, M. M., Favaro, E., Conaldi, P. G., Greening, J., Bottelli, A., Perin, P. C., Klein, N. J., Peakman, M., Camussi, G. 2003.** Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules. *Journal of Immunology*. 171(1):438-46.
- 212. Zoll, J., Heus, H. A., Van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J. 2009.** The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Research* 139(2):209–216.

**ANNEXES : TRAVAUX
ORIGINAUX ARTICLES &
MANUSCRIT**



Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system

Romain Volle^{a,b,c}, Céline Nourrisson^b, Audrey Mirand^{a,b,c}, Christel Regagnon^{b,c}, Martine Chambon^{a,b,c}, Cécile Henquell^{b,c}, Jean-Luc Bailly^{a,c}, Hélène Peigue-Lafeuille^{a,b,c}, Christine Archimbaud^{a,b,c,*}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, EA4843, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

^c Centre National de Référence des Entérovirus et Parechovirus, laboratoire associé: CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

A B S T R A C T

Article history:

Received 29 February 2012

Received in revised form 14 June 2012

Accepted 25 June 2012

Available online 2 July 2012

Keywords:

Enterovirus

Quantitative real-time RT-qPCR

Internal control

Cerebrospinal fluid specimens

Viral load

Human enteroviruses are the most frequent cause of aseptic meningitis and are involved in other neurological infections. Qualitative detection of enterovirus genomes in cerebrospinal fluid is a prerequisite in diagnosing neurological diseases. The pathogenesis of these infections is not well understood and research in this domain would benefit from the availability of a quantitative technique to determine viral load in clinical specimens. This study describes the development of a real-time RT-qPCR assay using hydrolysis TaqMan probe and a competitive RNA internal control. The assay has high specificity and can be used for a large sample of distinct enterovirus strains and serotypes. The reproducible limit of detection was estimated at 1875 copies/ml of quantitative standards composed of RNA transcripts obtained from a cloned echovirus 30 genome. Technical performance was unaffected by the introduction of a competitive RNA internal control before RNA extraction. The mean enterovirus RNA concentration in an evaluation series of 15 archived cerebrospinal fluid specimens was determined at 4.78 log₁₀ copies/ml for the overall sample. The sensitivity and reproducibility of the real time RT-qPCR assay used in combination with the internal control to monitor the overall specimen process make it a valuable tool with applied research into enterovirus infections.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human enteroviruses (EVs) are members of the *Picornaviridae* family, which includes small non enveloped RNA viruses. With more than 100 serotypes, EV strains are classified into four species designated from HEV-A to HEV-D, and the reference poliovirus serotypes are included in the HEV-C species (Stanway et al., 2005). EVs are associated with a number of common

Abbreviations: EV, enterovirus; IC, internal control; EV-RNA QS, enterovirus-RNA quantitative Standards; RT-qPCR, reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; Ct, threshold cycle; CSF, cerebrospinal fluid; EU-QCMD, European Union Quality Control for Molecular Diagnostics Proficiency Panel.

* Corresponding author at: Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 4 73 75 48 50; fax: +33 4 73 75 48 51.

E-mail addresses: romain.volle@u-clermont1.fr (R. Volle), celine.nourrisson@laposte.net (C. Nourrisson), amirand@chu-clermontferrand.fr (A. Mirand), cregagnon@chu-clermontferrand.fr (C. Regagnon), m_chambon@chu-clermontferrand.fr (M. Chambon), chenquell@chu-clermontferrand.fr (C. Henquell), J-Luc.BAILLY@u-clermont1.fr (J.-L. Bailly), hlafeuille@chu-clermontferrand.fr (H. Peigue-Lafeuille), carchimbaud@chu-clermontferrand.fr (C. Archimbaud).

illnesses such as hand foot and mouth disease (HFMD), myocarditis and acute hemorrhagic conjunctivitis, but the most vexing clinical syndromes caused by EVs are seen in patients with neurological infections, which result in an inflammatory reaction. The inflammatory process initiated by strains of the different EV serotypes can affect the subarachnoid space and lead to a meningitis syndrome, brain parenchyma (encephalitis), or both (meningoencephalitis) (Archimbaud et al., 2003; Rhoades et al., 2011; Robinson et al., 2002; Tauber and Moser, 1999). Encephalitis is a well-recognized but infrequent manifestation of central nervous system (CNS) infection by EVs (Tunkel et al., 2008). The most common neurological syndrome caused by EV infections is aseptic meningitis, which requires surveillance in both children and adults (Huraux et al., 2003; Peigue-Lafeuille et al., 2002; Ramers et al., 2000). EV meningitis occurs in sporadic forms and outbreaks of variable size, from local community outbreaks to large regional epidemics (Bailly et al., 2002; Khetsuriani et al., 2006).

The advent of molecular diagnosis over the last decade has allowed the sensitive, specific and rapid detection of EV genomes in cerebrospinal fluid (CSF) specimens. Previous studies suggested that the use of rapid molecular diagnosis of EV in children with meningitis has a clinical benefit by reducing antibiotic or antiviral

therapy, avoiding ancillary tests, reducing hospital related costs, and allowing earlier discharge (Archimbaud et al., 2009; Hamilton et al., 1999; Ramers et al., 2000; Robinson et al., 2002; Stellrecht et al., 2002). As several serotypes are involved in meningitis, the laboratory of virology of Clermont-Ferrand Hospital has also developed genotyping techniques to rapidly identify EV strains in biological samples (Bailly et al., 2002; Mirand et al., 2006). The feasibility of direct genotyping in CSF was shown in a large prospective study of patients with meningitis, which provided a more complete picture for the circulation patterns of EV strains than genotyping of virus strains after isolation in cell culture (Mirand et al., 2008).

Although qualitative molecular detection of EV in CSF is sufficient for diagnosis, a quantitative approach will be a valuable tool with research applications in the investigation of pathological processes during EV infections. Specifically, the determination of EV load in the CSF of patients with neurological manifestations would prove helpful in elucidating further the history of diseases caused by these infections. The quantitative genome detection of other viral pathogens in CSF specimens has been reported in patients with neurological disease and showed a clear association between a high viral load and the severity of neurological symptoms caused by Varicella-Zoster or Epstein-Barr Viruses (Aberle et al., 2005; Weinberg et al., 2002). With regard to EVs, one study in neonatal systemic infection showed a strong association of higher viral load in the blood with younger age and greater disease severity of neonatal Coxsackievirus B3 infection (Yen et al., 2007). However, few molecular amplification assays have been developed and used for the quantitation of EVs in CSF specimens (Monpoeho et al., 2002; Dalwai et al., 2009). The aim of this study was to upgrade a qualitative real-time RT-PCR described previously (Archimbaud et al., 2004) to a quantitative assay, including TaqMan hydrolysis probes, a competitive internal control to assess the quality of the analysis and quantitative RNA standards to assess EV loads in patients' CSF.

2. Material and methods

2.1. Enterovirus strains and cerebrospinal fluid specimens

The EV strains used in the study comprised 23 reference strains and 60 clinical strains that were originally isolated in cell cultures from biological specimens of CSF, throat, or stools at the virology laboratory of the University Hospital of Clermont-Ferrand. The virus samples were composed of one strain of each of the following serotypes: coxsackievirus (C) CA4, CA8, CA9, CA13, CA15, CA16, CB4, echovirus (E) E1, E9, E11, E15, E16, E17, E19, E20, E21, E24, E26, E27, E29, E31, E32, E33, EV69, EV70, EV71, and EV77; two strains of CB1, CB2, CB6, E2, E3, E5, E7, and E14; three strains of CB3, CB5, E4, E18, E25; seven strains of E13; and nine strains of E6 and E30. The E25 prototype strain (E25/JV-4) titrated at 1.3×10^7 tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀) per ml was serially diluted 10-fold in sterile water and used to evaluate internal control competition with EV template, and inter- and intra-assay variability.

Samples from the 2010 and 2011 European Union Quality Control for Molecular Diagnostics Proficiency Panel for enterovirus (EU-QCMD; Glasgow, UK) were also used in the study. They contained different amounts of various EV serotypes (CA9, CA16, CA21, CA24, CB3, E11, E30, EV71, and EV68). Three samples contained human parechovirus HPeV-3, and one sample human rhinovirus HRV-16.

Thirty nine CSF specimens collected from patients hospitalized for suspicion of aseptic meningitis were obtained from the collection of the laboratory. All the CSF specimens were conserved at -80°C until analysis. The CSF samples comprised 19 specimens tested positive for EV by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) with the NucliSens EasyQ[®] Enterovirus kit (bioMérieux,

Marcy l'Etoile, France) and 20 tested negative for EV with the same technique. EV genotyping in CSF specimens was done by nucleotide sequencing of gene 1D (the viral gene encoding the VP1 capsid protein) as described previously (Mirand et al., 2008).

2.2. Molecular design of primers and TaqMan probes

Real-time RT-qPCR primers EV1 (forward) and EV2 (reverse) are described elsewhere (Archimbaud et al., 2009, 2004). TaqMan hydrolysis probes EVPb (EV RNA template) and ICPb (internal control RNA template), and 5' overhanging end primers EV1pBR and EV2pBR (see Section 2.3), were designed using Primer 3 Input program (Rozen and Skaletsky, 2000). The specificity of all primers and probes was validated by BLAST analyses (Altschul et al., 1990). TaqMan probes (EVPb and ICPb) were respectively 5'-labelled with the fluorescent dye 6-carboxy-fluorescein (FAM) and dimethoxy-fluorescein (JOE) and respectively 3'-labelled with the quenching dye carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) and black hole quencher 1 (BHQ1). Sequences are given in Table 1.

2.3. Internal control construction

Internal control (IC) is an RNA chimera synthesized using a previously described method with minor modifications (Naze et al., 2009). Briefly, EV1pBR and EV2pBR primers were used to amplify a 217-bp segment chosen in the plasmid vector pBR322. Primer EV1pBR contained in 5'- to -3' order a *Sall* restriction endonuclease site, the sequence of the EV1 primer, and 20 bp homologous to bp 1655–1675 in pBR322. Primer EV2pBR contained in 5'- to -3' order a *Bam*HI site, the sequence of the EV2 primer and 20 bp homologous to bp 1795–1815 in pBR322. Amplification conditions were: 2 min at 94°C followed by 40 cycles with 15 s at 95°C , 50 s at 60°C and 30 s at 72°C and a final elongation step 5 min at 72°C . The resulting hybrid PCR product (IC DNA fragment) was purified with NucleoSpin[®] extract II kit (Macherey-Nagel) and cloned (*Sall*/*Bam*HI) into the T7 expression vector p0p24 (Michel et al., 2000). The sequence was checked by nucleotide sequencing. The *Eco*RI linearized recombinant p0p24 plasmid DNA was used as a template for *in vitro* transcription with RiboMAX[™] Large Scale RNA production System-T7 kit (Promega, Mannheim, Germany). Transcripts were treated with DNase I, purified with NucleoSpin[®] RNA Virus kit (Macherey-Nagel), and quantified by fluorimetry using the Quant-iT[™] Assays kit (Invitrogen). Internal control RNAs were then serially diluted 10-fold in RNase-free water from 2×10^5 to 2 copies/ μl , and stored in single-use aliquots at -80°C until use. Copy number of transcripts (cp) was calculated by using the equation: $\text{cp} = (C/M) \times N$, where C is the fluorimetry measured mass concentration, M is the molecular weight calculated for the transcripts ($372,570 \text{ g mol}^{-1}$) and N is the Avogadro's number ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

2.4. Preparation of the EV RNA quantitation standard

A synthetic EV RNA quantitation standard (EV-RNA QS) was constructed by cloning 576 nucleotides (nucleotide positions 66–642) from the highly conserved 5' untranslated EV region of the prototype echovirus 30 strain (Bastiani) into the T7 expression vector p0p24. An *in vitro* transcription reaction was performed following the procedure described above for IC construction. Concentration of EV-RNA QS was obtained using Quant-iT[™] Assays kit (Invitrogen). In order to obtain a standard curve for the EV RT-qPCR assay, the EV-RNA QS was serially diluted 10-fold in RNase-free water from 6×10^5 to 6 copies/ μl and stored in single-use aliquots at -80°C . Copy number of the transcripts was calculated using the above equation ($M = 501,270 \text{ g mol}^{-1}$).

Table 1
Primers and probes for detection and quantitation of enterovirus (EV) and internal control (IC).

Target	Primer or probe	Sequence (5' to 3')	Tm ^b (°C)	Nucleotide positions ^a
Enterovirus	EV1 (Forward) ^c	5'-CCTGAATGCGGCTAATCC-3'	56	456–474
	EV2 (reverse) ^c	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCC-3'	56	583–602
	EVpB ^d	FAM-ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTC-Tamra	63	553–579
Internal control	EV1pBR (Forward) ^e	5'-ATCAGTCGACCCCTGAATGCGGCTAATCCCATTATGTTCCGGATCTGC-3'	60	1655–1675
	EV2pBR (reverse) ^e	5'-ATCTGGATCCATTGTCACCATAAGCAGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGA-3'	60	1795–1815
	ICPb ^{d,f}	JOE-CTACCC _x TGTGGAACACCTACATCTGTA-BHQ-1	63	1693–1720

^a Enterovirus sequence based on GenBank accession nos.: AF231765 for coxsackievirus B3 and pBR322 sequence based on New England Biolabs accession.

^b Melting temperature estimated in °C by Invitrogen for primers and Sigma Genosys for probes.

^c The enterovirus primers (EV1 and EV2) were previously reported by Archimbaud et al. (2009, 2004).

^d The two TaqMan probes (EVpB and ICPb), designed by Primer 3 Input and synthesized by Sigma Genosys, were labelled with the 5'reporter fluorophore FAM and JOE respectively, and 3'-labelled with the quenching dye Tamra and black hole quencher1 (BHQ1).

^e Oligonucleotide portions homologous to the plasmid vector are in boldface, sequences homologous to enteroviral primer sequences (EV1 and EV2) are shown in italics, and sequences homologous to *Sall* and *BamHI* restriction site are underlined nucleotides.

^f Letter X indicates a LNATM C base (here, LNA offers the possibility of adjusting Tm values of primers and probes in multiplex assays).

2.5. Extraction of viral RNA

Viral RNAs were extracted from CSF specimens or viral suspensions (200 µl) using the NucliSens[®] EasyMAGTM extractor (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Purified RNAs were eluted with 25 µl of elution solution and analysed immediately or stored at –80 °C until use. The in-house competitive IC (10 µl, 200 copies/µl) was added before extraction to assess the efficiency of EV RNA extraction and gene amplification (see Section 3.2).

2.6. Amplification conditions for the one-step multiplex real-time RT-qPCR assay

The real-time RT-qPCR assay was carried out in a final volume of 20 µl. Five µl of RNA extract (including IC) or EV-RNA QS was added to 15 µl of reaction mixture prepared using the LightCycler[®] RNA Master HybProbe kit (Roche). The reaction mixture contained 3.25 mM of Mn(OAc)₂; 700 nM each of the EV1 and EV2 primers; 200 nM each of the EV and IC TaqMan probes; and 1X final of LC[®] RNA Master HybProbe solution. Final volume was made up to 20 µl with RNase-Free Water. Real time RT-qPCR assay was carried out on a Rotor-GeneTM 6000 (Qiagen) under the following conditions: reverse transcription at 61 °C for 20 min, Hot-Start Taq DNA polymerase activation at 95 °C for 2 min, and 45 amplification cycles including denaturation at 95 °C for 5 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min. Fluorescence data were recorded at the end of each cycle. PCR product sizes were 145 bp for EV and 197 bp for IC. The samples in which IC amplification failed or occurred later than three cycles greater than the average Ct of 30.26 in negative controls (see Section 3.2) were considered to be inhibited and not reliable for quantitation of EV genomes.

2.7. Standardization of the multiplex real-time RT-qPCR assay

2.7.1. Sensitivity

The sensitivity of the RT-qPCR assay was evaluated in four replicates using 10-fold serial dilutions in RNase free water (ranging from 6 × 10⁵ to 6 copies/µl) of the EV-RNA QS. The reproducible limit of detection was determined by twelve replicates using series of 2-fold dilutions in RNase-free water of the EV-RNA QS (copies ranged from 60 to 7.5 copies/µl).

2.7.2. Optimal IC concentration

The optimal IC concentration was determined in duplicate by adding 10 µl of the 10-fold serially diluted IC preparation (ranging from 2 × 10⁵ to 2 copies/µl) to 200 µl of EV negative CSF specimens. Optimal IC concentration was then tested by comparison in a same RT-qPCR run of the EV sensitivity, amplification efficiency and Ct

values of 10-fold serial dilution of the E25/JV-4 suspension (from 1.3 × 10⁵ TCID₅₀/ml to 1.3 TCID₅₀/ml) extracted with and without IC. Reproducibility of the IC amplification was assessed by evaluating the variation in the IC Ct values in five replicates of 10-fold serial dilution of E25/JV-4 suspension.

2.7.3. Reproducibility

The reproducibility of the assay was assessed in four replicate tests with 10-fold serial dilution of EV-RNA QS (from 6 × 10⁵ to 60 copies/µl) and extracts from 10-fold serial dilutions of the E25/JV-4 (from 1.3 × 10⁵ TCID₅₀/ml to 1.3 TCID₅₀/ml). Samples of water extracted with or without IC were used as negative controls.

2.7.4. Reliability and specificity

The specificity of the assay was determined using non EV control strains and 20 CSF specimens found negative for EV with NASBA assay. Different non EV control strains were tested: human rhinovirus (HRV) serotypes A22, A89, B3, B79, C12 and C15; human parechoviruses (HPeV) HPeV-1, HPeV-2, and HPeV-3 (laboratory virus collection); adenovirus (ADV) strain VR-7; herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain VR-3 and type 2 (HSV-2) strain MS; cytomegalovirus (CMV) strain AD169 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC); and one strain of Epstein Barr Virus (EBV) kindly provided by Dr. Jean-Marie Seigneurin (Virology laboratory of Grenoble, France). The reliability of the real-time RT-qPCR assay was assessed by testing different EV strains, EU-QCMD and EV positive CSF specimens as listed above in Section 2.1.

3. Results

3.1. Detection limit of the real-time RT-qPCR assay

The detection limit of the assay was estimated at 6 copies/µl, which is equivalent to 750 copies/ml of CSF sample, in three of the four replicates with a mean inter assay Ct value of 40.08, a standard deviation of 3.11 cycles and a coefficient of variation of 7.76% (Fig. 1. and Table 2). The linear regression line generated by plotting Ct values against numbers of copies/µl gave amplification efficiencies from 80 to 90% and showed a strong linear relationship (r^2 value from 0.9935 to 0.9983). To improve the threshold of detection, twelve replicates of 2-fold serial dilutions of EV-RNA QS comprising 60, 30, 15 and 7.5 copies/µl were quantified. According to probit regression analysis, the lowest concentration of viral RNA which could be detected with ≥ 90% probability was 15 copies/µl (95% CI = 10–20 copies/µl). This is equivalent to 1875 copies/ml (1250–2500) (data not shown).

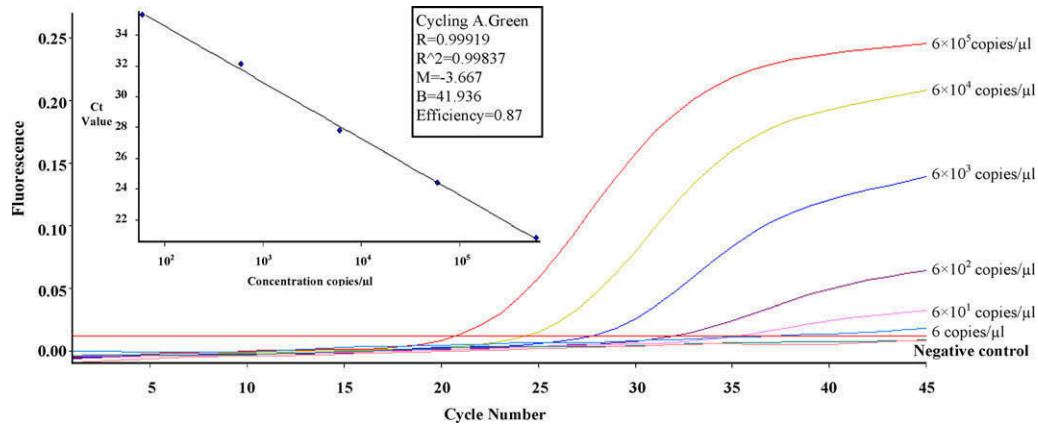


Fig. 1. Sensitivity of the real-time RT-qPCR assay for enteroviruses. Sensitivity was obtained from 10-fold serial dilutions of RNA standards of the prototype strain E30 (ranging from 6×10^5 to 6 copies/ μ l) tested in the same experiment. The x-axis represents cycle number and y-axis represents fluorescence. The increase in fluorescence at a particular cycle number represents the cycle threshold (Ct) for that sample, which indicates the detection of nucleic acids. Correlation coefficient (R^2 value) and amplification efficiency obtained from the linear regression line generated by plotting Ct values against copy number is shown, as given by the Rotor-GeneTM software: $R^2 = 0.9983$, efficiency = 0.87.

3.2. Determination of the IC optimal concentration

The optimal concentration for IC was defined as the lowest amplifiable and reproducible amount of IC that did not affect amplification of the EV template in real-time RT-qPCR assay. The lowest amount of IC that can be amplified in the assay was 200 copies per extraction (i.e. 10 μ l of IC at 20 copies/ μ l). The Ct value was 40.24, but the fluorescence signal was low. To avoid inconsistent amplification of IC when it is associated with large amounts of EV, a concentration of 200 copies/ μ l (2000 copies per extraction) was chosen for further experiments.

Competition between IC (10 μ l, 200 copies/ μ l) and the EV template was tested by comparing Ct values obtained in dilution series of E25/JV-4 virus suspension after extraction with and without IC (Fig. 2). Results showed that IC did not compromise detection, quantitation and amplification efficiency of the EV template. The reproducibility of IC detection (mean Ct values \pm standard deviation) was estimated at 29.87 ± 0.87 (coefficient of variation range between 1.73% and 4.68%) from five replicate tests of different amounts of EV template (Fig. 3). In negative control tests (no EV template), IC was detected at a Ct value of 30.26 ± 0.65 with a coefficient of variation of 2.15%.

3.3. Specificity and reliability of the EV real-time RT-qPCR assay

Under the optimal conditions determined above for the EV real-time RT-qPCR assay, amplification of the EV template was successful with 83 EV suspensions, which represented an overall number of 43 distinct EV serotypes. Specificity was investigated by testing different virus samples, including common non picornavirus controls (HSV-1, HSV-2, ADV, CMV, and EBV), non EV picornavirus controls (HPeV-1, -2 and -3; HRV-A16, -A22, -A89, -B3, -B79, -C12, and -C15), and EV negative CSF specimens. Amplification by the EV RT-qPCR assays was negative in all these samples. Amplification of IC was effective in all tests without PCR inhibitors detected.

3.4. Reproducibility and repeatability of the EV real-time RT-qPCR assay

To assess the inter-assay reproducibility of the quantitative assay for EV template amplification, five EV-RNA QS (testing range: 6×10^5 to 60 copies/ μ l) and RNA extracts from the 10-fold dilution series of the E25/JV-4 suspension (testing range: 1.3×10^5 to 1.3 TCID₅₀/ml) were tested in four independent assays (Table 2).

Table 2
Inter-assay reproducibility and intra-assay repeatability of the EV real-time RT-qPCR.

Enterovirus standards	Inter-assay						Intra-assay						
	Replicate Ct value ^a				Ct mean (±SD ^b)	% CV ^c	Replicate Ct value ^a					Ct mean (±SD ^b)	% CV ^c
	1	2	3	4			1	2	3	4	5		
EV-RNA QS (copies/μl)													
6 × 10 ⁵	19.90	19.94	19.52	18.91	19.57 (±0.48)	2.44							
6 × 10 ⁴	23.62	23.66	23.72	23.16	23.54 (±0.26)	1.09							
6 × 10 ³	28.15	28.19	27.65	27.31	27.83 (±0.42)	1.52	26.94	27.33	27.15	27.09	26.9	27.08 (±0.17)	0.64
6 × 10 ²	30.71	30.76	30.67	30.1	30.56 (±0.31)	1.01							
6 × 10 ¹	34.35	34.42	35.7	35.31	34.95 (±0.67)	1.91	34.55	35.51	34.94	35.64	35.99	35.33 (±0.58)	1.63
6 × 10 ⁰	41.79	41.97	36.49	NA ^d	40.08 (±3.11)	7.76							
E25/JV-4 (TCID50/ml)													
1.3 × 10 ⁵	16.32	16.08	15.3	15.23	15.73 (±0.55)	3.49							
1.3 × 10 ⁴	20.07	19.76	19.23	19.92	19.79 (±0.37)	1.85	20.38	20.55	20.67			20.53 (±0.15)	0.71
1.3 × 10 ³	24.16	24.07	23.19	23.37	20.70 (±0.49)	2.36							
1.3 × 10 ²	28.31	27.3	26.47	26.88	27.24 (±0.79)	2.9	27.99	27.97	28.6			28.19 (±0.36)	1.27
1.3 × 10 ¹	31.48	30.8	31.12	31.28	31.17 (±0.29)	0.92							
1.3	33.12	33.36	37.03	35.9	34.85 (±1.92)	5.51	34.03	33.27	34.03			33.78 (±0.44)	1.3

^a Threshold cycle (Ct) values determined by RT-qPCR with threshold level of 0.0125.

^b Standard deviation.

^c % Coefficient of variation = (SD/Ct mean) \times 100.

^d Not amplified.

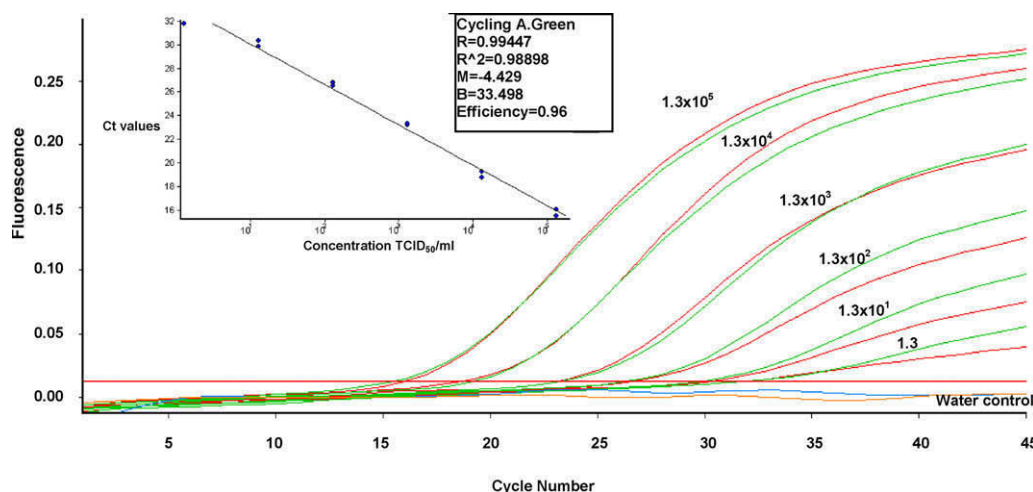


Fig. 2. Validation of the optimal concentration of the internal control. Optimal IC concentration was validated from 10-fold serial dilution of titrated viral E25/JV-4 virus suspension (ranging from 1.3×10^5 to $1.3 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$) extracted with (Red) and without (Green) 2000 copies of IC and further amplified in a same multiplex real-time RT-qPCR assay. Water control extracted with IC is represented in Orange line and without IC in Blue line. Correlation coefficient (R^2 value) and amplification efficiency obtained from the linear regression line generated by plotting Ct values against copy number is shown, as given by the Rotor-GeneTM software: $R^2 = 0.988$, efficiency = 0.96. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

The standard deviations of the mean Ct value for EV-RNA QS ranged from 0.26 to 0.67, with coefficients of variation from 1.01% to 2.44%. The EV-RNA QS at $6 \text{ cp}/\mu\text{l}$ was not included because of its non reproducibility (see result, Section 3.1). The standard deviation of mean Ct value for the E25/JV-4 samples ranged from 0.29 to 1.92 (coefficients of variation: 0.92–5.51%).

To assess the intra-assay repeatability of the EV quantitative assay, EV-RNA QS at a concentration of 6×10^3 and 60 copies/ μl , and extracts from the dilution series of E25/JV-4 suspension (testing concentrations: 1.3×10^4 , 1.3×10^2 and $1.3 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$) were respectively tested five and three times in the same runs (Table 2). The standard deviation of the mean Ct value for 6×10^3 and 60 copies/ μl of EV-RNA QS were respectively 0.17 and 0.58 cycle, giving a coefficient of variation of 0.64% and 1.63%. The standard deviation of the mean Ct value for 1.3×10^4 , 1.3×10^2 and $1.3 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ of E25/JV4 RNA were respectively 0.15, 0.36 and 0.44 cycle, giving a coefficient of variation of 0.71%, 1.27% and 1.30%.

3.5. Performance of the real-time RT-qPCR assay in testing the EU-QCMD EV panel

Qualitative and quantitative performances of the real-time RT-qPCR EV assay were tested with the 2010 and 2011 EU-QCMD proficiency panels. For each panel, samples were processed in the

same way as CSF specimens. In qualitative tests, the assay detected all but one EV positive specimens, a specimen in the 2011 EU-QCMD proficiency panel, which contained a low amount ($3.2 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$) of an enterovirus 68 strain. The real-time RT-qPCR assay was also included within the category “Real-time in-house technique” for quantitative investigations in the 2010 and 2011 round tests. Quantitation tests were successful for all positive samples of the 2010 panel and the concentrations estimated for the specimens were in the range of the mean values (copies/ $\text{ml} \pm 1$ Standard Deviation) except for one specimen containing a CA9 strain, which was underestimated. Of ten positive samples comprising the 2011 panel, five gave results of quantitation within the range of the mean values (copies/ $\text{ml} \pm 1$ Standard Deviation). The template concentration was overestimated in three samples (CA21, CA24, and EV71 templates), and the two dilutions of the EV68 strain were poorly or not quantified.

3.6. Determination of EV load in CSF specimens

The EV real-time RT-qPCR assay was performed in the CSF of 39 patients presenting with signs of meningitis. A total of 18 CSF specimens were found to be qualitatively positive by the RT-qPCR and the NASBA assay, and 20 were found to be negative by both molecular assays. Amplification by the RT-qPCR failed for one specimen

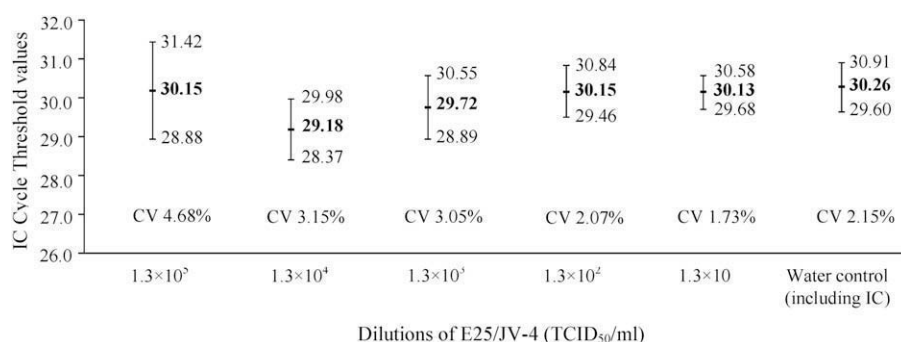


Fig. 3. Reproducibility of the optimal concentration of the internal control with various concentrations of enterovirus. Internal control reproducibility was determined by evaluating the variation of IC threshold cycle values in 5 replicates of 10-fold serial dilutions of E25/JV-4 suspension. The mean Ct value is noted in boldface, with error bars representing \pm standard deviation. The coefficient of variation (CV) is indicated.

Table 3

Genotyping and quantitation of enterovirus load in cerebrospinal fluid samples in 2007.

Serotype (n = 19)	E30 (n = 6) ^a	CB2 (n = 5) ^{a,b}	E18 (n = 3)	CA9 (n = 1)	E9 (n = 1)	E11 (n = 1)	E13 (n = 1)	E25 (n = 1) ^a
Mean viral loads log ₁₀ copies/ml (±SD)	4.54 (±0.33)	3.81 (±0.69)	4.68 (±0.38)	5.10	4.80	5.64	4.95	<3.27

^a One sample was found below the quantitation threshold (1875 copies/ml) and so was not included.^b One CSF specimen was not amplified.

containing a CB2 virus strain. Amplification of the IC was effective for all specimens. Viral quantitation was determined in 15 of the 18 positive specimens and 3 specimens had viral loads estimated at 1508, 1273 and 1000 copies/ml, below the reproducible quantitation limit of 1875 copies/ml. Viral load ranged from 3.81 to 5.64 log₁₀ copies/ml, with a mean viral load (±standard deviation) of 4.78 (±0.56) log₁₀ copies/ml. E30 was the most frequent serotype (31.6%) among the EV positive CSF specimens and its mean viral load was 4.54 (±0.33) log₁₀ copies/ml (Table 3). The mean viral loads for serotypes CB2 (26.3% of the sample) and E18 (15.8%) were 3.81 (±0.69) and 4.68 (±0.38) log₁₀ copies/ml respectively. The other serotypes (CA9, E9, E11, E13) were only represented once in the CSF sample and displayed viral loads of 5.10, 4.80, 5.64, 4.95 copies/ml respectively.

4. Discussion

This study describes the development of a new in-house internally controlled real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of human EVs in biological samples. The assay uses the hydrolysis probe (TaqMan) to monitor the amplification of the template, and is performed in a one-step single closed tube in less than 2 hours. The assay has the advantages of limiting the number of manipulations, thereby minimizing the risk of carry-over contamination, of increasing analytical speed, and of detecting simultaneously the EV template and IC. The performance characteristics of the assay were recorded according to the recommendations of Rabenau et al. (2007). The assay developed displayed high specificity with a primer set described previously (Archimbaud et al., 2004), which targets the highly conserved 5' untranslated region of human EVs (Rotbart, 1990). It can be used for a large sample of EV strains and serotypes but detection of EV68 is not possible because of a mismatch between the genome of EV68 and reverse primer EV2. Cross reactions were not found with human rhinoviruses and human parechoviruses, which are genetic relatives of human EVs. The 90% detection limit using *in vitro* transcribed E30 RNA standards is 1875 copies/ml of sample. Various detection limits have been reported for EV amplification with other techniques using TaqMan probe technology. One main difference between the techniques, which may considerably affect their sensitivity, is the virus origin of the RNA standards. The reported sensitivities of techniques for detecting EV in CSF using TaqMan probes are 3800 copies/ml with CB3 RNA standards (Dierssen et al., 2008) or 3500 copies/ml with Poliovirus type 1/Mahoney RNA standards (Monpoeho et al., 2002). In a multiplex technique developed for the specific detection of EV70 and CA24 RNA templates, sensitivities were 2500 copies/ml (EV-70) and 25,000 copies/ml (CA-24) (Xiao et al., 2009). Another multiplex technique developed for detecting Enterovirus and Parechovirus simultaneously, had a sensitivity of 420 copies/ml using E-7 RNA standards (Bennett et al., 2011). Another factor involved in possible sensitivity variations is the particular chemistry used (different reaction mixture, thermocycler, and probe labelling) in each technique (Hayden et al., 2012). The values for inter-assay and intra-assay variability for the EV real-time RT-qPCR assay determined with high and low amounts of

RNA template and with high and low amounts of infectious units of E25/JV-4 were in agreement with those reported for another assay using TaqMan probes (Monpoeho et al., 2002). The overall characteristics of the EV real-time RT-qPCR assay described in this study showed consistent repeatability and reproducibility. Analysis of EV quality control samples of the 2010 and 2011 EU-QCMD panels (Glasgow, UK) made of distinct EV serotypes at different concentrations showed reliable detection. Unsuccessful amplification occurred only with the EV68 RNA template because of mismatch in one primer. Viral loads determined with EV real-time RT-qPCR assay were in the range of the mean values (±1 SD) recorded by the participating laboratories. However, the significance of quantitative results is currently debated because of a high inter-laboratory variability for each viral sample due to wide ranges in viral load values. For instance, with 2011 EU-QCMD, standard deviations of the mean viral loads for the overall participants ranged from 0.12 to 1.12 log₁₀ copies/ml. This wide inter-laboratory variability with identical EV strain samples highlights the need for a common quantitative standard and also points to the difficulty of comparing quantitative results for viruses other than HIV and hepatitis C virus (Hayden et al., 2012).

A common weakness of a number of EV real-time RT-qPCR assays is the lack of IC to monitor false negative results due to PCR inhibitors or failure in nucleic acid extraction and detection in RT-PCR steps (Archimbaud et al., 2004; Dierssen et al., 2008). The IC RNA included in the assay is amplified competitively with the same set of primers dedicated to the specific amplification of the EV template. Another major interest of the IC RNA is its incorporation directly in the biological specimens to be tested before RNA extraction, which allows close monitoring of the entire sample process (Naze et al., 2009; Villanova et al., 2007; Xiao et al., 2009). Because of its competitive property, particular attention has been paid to the molecular design of IC to avoid cross hybridization with the EV template genome and to ensure optimal amplification of both IC and EV templates. The optimal IC amount added to the specimens before RNA extraction was estimated at 2000 copies for a reproducible and non inhibiting amplification of the EV template. The technical performance of the EV real-time RT-qPCR assay was unaffected by the addition of IC RNA, and, in addition, IC was detected consistently in samples of viral suspension and CSF.

The quantitation of EV RNA was also determined in 15/18 archived CSF specimens positive for human EVs with a mean viral load of 4.78 log₁₀ copies/ml. This is consistent with findings of previous reports in which mean viral loads were of the order of 4.8 and 4.6 log₁₀ copies/ml of CSF in patients with EV aseptic meningitis or EV encephalitis (Dalwai et al., 2009; Monpoeho et al., 2002). For three specimens, the viral load was determined below the quantitation threshold (1875 copies/ml). In one specimen containing a CB2 strain, the viral RNA was undetected, probably because of a weak viral load. This hypothesis is supported by the low viral load obtained for three other specimens containing CB2 strains, compared with that of the other EV serotypes. In addition, in specimens with a low amount of RNA template, loss during freezing and thawing is an increased hazard. Precise molecular

genotyping by VP1 semi-nested amplification and sequencing is performed prospectively and directly in the CSF specimens in the routine practice of our virology laboratory (Mirand et al., 2008). Further studies with larger numbers of biological samples are needed to determine any relationship between viral load and EV genotype.

5. Conclusions

The quantitation of enteroviruses in biological specimens is a valuable tool with research applications and will make it possible to accurately assess EV loads in CSF specimens. In combination with diagnostic and genotyping tests, it could complete prospective investigations of meningitis and more severe neurological diseases associated with EV (encephalitis or neonatal infections). When trying to identify the *in vivo* processes involved in the rapid recovery from EV meningitis, we need to consider potential variations between different serotypes. The RT-qPCR and EV genotyping assays could be a useful aid in future investigations of the multiple aspects of the clearance process of EV from CSF and meninges. Future studies will examine the prospective application of the assay to determine EV load in concurrent specimens of blood and CSF, which should provide a better understanding of the pathogenesis of human EV infections.

Acknowledgements

The laboratory (EA4843) is supported by grants from « Université d'Auvergne ». The authors acknowledge the technical staff of the University Hospital of Clermont-Ferrand involved in the diagnosis of Enterovirus infections in patients. The authors thank Katy Kean, Pasteur Institute, Paris for providing the T7 expression vector pOp24, and Jeffrey Watts for help with preparation of the English manuscript.

References

- Aberle, S.W., Aberle, J.H., Steininger, C., Puchhammer-Stockl, E., 2005. Quantitative real time PCR detection of Varicella-zoster virus DNA in cerebrospinal fluid in patients with neurological disease. *Medical Microbiology and Immunology* 194, 7–12.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Archimbaud, C., Bailly, J.L., Chambon, M., Tournilhac, O., Travade, P., Peigue-Lafeuille, H., 2003. Molecular evidence of persistent echovirus 13 meningoencephalitis in a patient with relapsed lymphoma after an outbreak of meningitis in 2000. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4605–4610.
- Archimbaud, C., Mirand, A., Chambon, M., Regagnon, C., Bailly, J.L., Peigue-Lafeuille, H., Henquell, C., 2004. Improved diagnosis on a daily basis of Enterovirus meningitis using a one step real-time RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology* 74, 604–611.
- Archimbaud, C., Chambon, M., Bailly, J.L., Petit, I., Henquell, C., Mirand, A., Aublet-Cuvelier, B., Ughetto, S., Beytout, J., Clavelou, P., Labbé, A., Philippe, P., Schmidt, J., Regagnon, C., Traore, O., Peigue-Lafeuille, H., 2009. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *Journal of Medical Virology* 81, 42–48.
- Bailly, J.L., Brosson, D., Archimbaud, C., Chambon, M., Henquell, C., Peigue-Lafeuille, H., 2002. Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. *Journal of Medical Virology* 68, 558–567.
- Bennett, S., Harvala, H., Witteveldt, J., McWilliam Leitch, E.C., McLeish, N., Templeton, K., Gunson, R., Carman, W.F., Simmonds, P., 2011. Rapid simultaneous detection of enterovirus and parechovirus RNAs in clinical samples by one-step real-time reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 2620–2624.
- Dalwai, A., Ahmad, S., Pacsa, A., Al-Nakib, W., 2009. Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait. *Journal of Clinical Virology* 44, 48–51.
- Dierrsen, U., Rehren, F., Henke-Gendo, C., Harste, G., Heim, A., 2008. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology* 42, 58–64.
- Hamilton, M.S., Jackson, M.A., Abel, D., 1999. Clinical utility of polymerase chain reaction testing for enteroviral meningitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 18, 533–537.
- Hayden, R.T., Yan, X., Wick, M.T., Rodriguez, A.B., Xiong, X., Ginocchio, C.C., Mitchell, M.J., Caliendo, A.M., 2012. Factors contributing to variability of quantitative viral load PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 337–345.
- Huraux, J.M., Nicolas, J.C., Agut, H., Peigue-Lafeuille, H., 2003. *Traité de virologie médicale*. Agence universitaire de la francophonie. estem, pp. 389–406.
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., 2006. Enterovirus surveillance United States, 1970–2005. *MMWR. Surveillance Summaries* 55, 1–20.
- Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M., Borman, A.M., 2000. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32268–32276.
- Mirand, A., Archimbaud, C., Henquell, C., Michel, Y., Chambon, M., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J.L., 2006. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *Journal of Medical Virology* 78, 1624–1634.
- Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonne, F., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J.L., 2008. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 87–96.
- Monpouho, S., Coste-Burel, M., Costa-Mattioli, M., Besse, B., Chomel, J.J., Billaudel, S., Ferré, V., 2002. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21, 532–536.
- Naze, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., Zeller, H., Staikowsky, F., Grivard, P., Michault, A., Laurent, P., 2009. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *Journal of Virological Methods* 162, 1–7.
- Peigue-Lafeuille, H., Croquez, N., Laurichesse, H., Clavelou, P., Aumaitre, O., Schmidt, J., Maillet-Vioud, M., Henquell, C., Archimbaud, C., Bailly, J.L., Chambon, M., 2002. Enterovirus meningitis in adults in 1999–2000 and evaluation of clinical management. *Journal of Medical Virology* 67, 47–53.
- Rabenau, H.F., Kessler, H.H., Kortenbusch, M., Steinhilber, A., Raggam, R.B., Berger, A., 2007. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of Clinical Virology* 40, 93–98.
- Ramers, C., Billman, G., Hartin, M., Ho, S., Sawyer, M.H., 2000. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 283, 2680–2685.
- Rhoades, R.E., Tabor-Godwin, J.M., Tsueng, G., Feuer, R., 2011. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology* 411, 288–305.
- Robinson, C.C., Willis, M., Meagher, A., Gieseke, K.E., Rotbart, H., Glodé, M.P., 2002. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 21, 283–286.
- Rotbart, H.A., 1990. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 438–442.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132, 365–386.
- Stanway, G., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypä, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lemon, S.M., Minor, P.D., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Skern, T., 2005. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses vol., London, Elsevier edn. Family Picornaviridae, pp. 757–778.
- Stellrecht, K.A., Harding, I., Woron, A.M., Lepow, M.L., Venezia, R.A., 2002. The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *Journal of Clinical Virology* 25 (Suppl. 1), S19–S26.
- Tauber, M.G., Moser, B., 1999. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 28, 1–12.
- Tunkel, A.R., Glaser, C.A., Bloch, K.C., Sejvar, J.J., Marra, C.M., Roos, K.L., Hartman, B.J., Kaplan, S.L., Scheld, W.M., Whitley, R.J., 2008. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 47, 303–327.
- Villanova, G.V., Gardiol, D., Taborda, M.A., Reggiardo, V., Tanno, H., Rivadeneira, E.D., Perez, G.R., Giri, A.A., 2007. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3555–3563.
- Weinberg, A., Li, S., Palmer, M., Tyler, K.L., 2002. Quantitative CSF PCR in Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Annals of Neurology* 52, 543–548.
- Xiao, X.L., Wu, H., Li, Y.J., Li, H.F., He, Y.Q., Chen, G., Zhang, J.W., Yang, H., Li, X.F., Yang, X.Q., Yu, Y.G., 2009. Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by multiplex real-time RT-PCR using an internal control. *Journal of Virological Methods* 159, 23–28.
- Yen, M.H., Tsao, K.C., Huang, Y.C., Huang, C.G., Huang, Y.L., Lin, R., Chang, M.L., Huang, C.C., Yan, D.C., Lin, T.Y., 2007. Viral load in blood is correlated with disease severity of neonatal coxsackievirus B3 infection: early diagnosis and predicting disease severity is possible in severe neonatal enterovirus infection. *Clinical Infectious Diseases* 44, 78–81.

Variations in Cerebrospinal Fluid Viral Loads Among Enterovirus Genotypes in Patients Hospitalized With Laboratory-Confirmed Meningitis Due to Enterovirus

Romain Volle,¹ Jean-Luc Bailly,^{1,2} Audrey Mirand,^{1,2} Bruno Pereira,³ Stéphanie Marque-Juillet,⁴ Martine Chambon,^{1,2} Christel Regagnon,² Amélie Brebion,^{1,2} Cécile Henquell,² Hélène Peigue-Lafeuille,^{1,2} and Christine Archimbaud^{1,2}

¹Epidémiologie et pathogénie des infections à entérovirus, Université d'Auvergne, Clermont Université, and ²CNR Enterovirus/Parechovirus laboratoire associé, Service de Virologie, and ³Délégation Recherche Clinique Innovation, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, and ⁴CH Versailles, Laboratoire de Microbiologie, Le Chesnay, France

Background. Acute enterovirus (EV) meningitis is a major cause of hospitalization among adults and children. It is caused by multiple EV genotypes assigned to 4 species (EV-A, EV-B, EV-C, and EV-D).

Methods. We determined viral loads in the cerebrospinal fluid (CSF) of 156 patients of all ages with EV meningitis during a 5-year observational prospective study. The virus strains were genotyped, and their time origin was determined with Bayesian phylogenetic methods.

Results. The CSF viral loads ranged between 3.4 and 7.5 log₁₀ copies/mL (median, 4.9 log₁₀ copies/mL). They were higher in neonates than in infants and children ($P = .02$) but were comparable in adults. Viral loads were associated with EV genotypes ($P < .001$). The EV strains were identified in 152 of 156 patients and assigned to 23 genotypes within the EV-A and EV-B species. The most frequent genotypes, echoviruses 6 and 30, were associated with different viral loads ($P < .001$). The highest viral loads were in meningitis cases caused by coxsackievirus A9, B4, and B5 genotypes. Most patients infected by a same genotype were infected by a major virus variant of recent emergence.

Conclusions. The variations in CSF viral loads in patients at the onset of EV meningitis are related to genotypic differences in the virus strains involved.

Keywords. Enterovirus meningitis; pleocytosis; adults; children; infants; neonates; Enterovirus genotypes; CSF viral load; meningitis pathophysiology.

Human enterovirus (EV) diseases can be caused by 100 genotypes that are classified according to genetic relationships into 4 species designated, EV-A, EV-B, EV-C, and EV-D [1]. A number of EV genotypes infect the central nervous system and are responsible for clinical manifestations including meningitis, encephalitis, and, more rarely, paralytic myelitis, cerebellar ataxia,

and Guillain-Barré syndrome [2–5]. The 61 genotypes within the EV-B species are the most common cause of acute meningitis, a self-limiting inflammation of the meninges characterized by favorable outcome and a major reason for admission to hospital of children and young adults [6–9]. EV meningitis occurs as outbreaks of variable size, from local community outbreaks to large epidemics [10, 11].

Diagnosis of EV infection in patients with suspected meningitis relies on examining cerebrospinal fluid (CSF) with rapid nucleic acid amplification tests (reverse-transcription polymerase chain reaction [RT-PCR]), a procedure that avoids unnecessary investigations and antimicrobial administration [7, 8]. The early differential identification of EV genotypes involved in neurological syndromes is important for outbreak and patient management, in particular when enterovirus 71

Received 6 December 2013; accepted 7 March 2014.

Correspondence: Christine Archimbaud, PhD, Centre National de Référence des Enterovirus et Parechovirus Laboratoire associé, Laboratoire de Virologie, CHU de Clermont-Ferrand; Centre de Biologie, 58 rue Montalembert 63003 Clermont-Ferrand Cedex (carchimbaud@chu-clermontferrand.fr).

The Journal of Infectious Diseases

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiu178

(EV71) and poliovirus genotypes are involved [12, 13]. Epidemiological surveys suggest that neurotropism and pathogenic features vary among EV genotypes [4]. Data regarding the CSF viral loads in patients with neurological conditions are scant but would prove helpful in elucidating further the history of EV infections. The quantitative genome detection of herpesviruses in patients with neurological diseases showed a clear relationship between high viral load in CSF and the severity and outcome of disease [14, 15]. A few methods have been developed to determine EV RNA levels in clinical samples [16, 17], but none have been used prospectively in large observational studies. The investigation of systemic coxsackievirus B3 (CVB3) infections in 10 neonates suggested a relationship between higher viral load in blood and younger age and greater disease severity [18]. We recently described a method based on TaqMan real-time RT-PCR coupled with an internal control RNA to quantify the EV genomes in CSF [19]. As a first step toward the investigation of pathogenic features of neurotropic EVs, we determined the concentration of EV RNA in CSF specimens from patients with acute meningitis and analyzed possible relationships between CSF viral loads and biological, clinical, and virological characteristics.

METHODS

Patients and Clinical Samples

This study was approved by the local committee for the protection of human subjects (Comité d’Ethique des Centres d’Investigation Clinique de l’Inter-Région Rhône-Alpes-Auvergne, France) with a waiver of informed consent (institutional review board number 5044).

A total of 156 patients with laboratory-confirmed EV meningitis were included in the study. They were hospitalized between 1 January 2008 and 31 December 2012 at the University Hospital of Clermont-Ferrand ($n = 133$) and between June and August 2011 in the Pediatric Unit of the Hospital of Versailles ($n = 23$). Patients were distributed as follows: 19 (12%) were neonates (median age, 21 days; range, 9–28 days), 27 (17%) were infants (median age, 40 days; range, 30–458 days), 57 (37%) were children (median age, 6 years; range, 2–15 years), and 53 (34%) were adults (median age, 31 years; range, 17–57 years). All neonates were full-term, and no patient was immunocompromised. In all patients, bacteriological investigations and results of tests for molecular detection of herpes simplex virus were negative.

EV molecular diagnosis was based on analysis of CSF specimens obtained at patient admission, using either the NucliSENS EasyQ^R Enterovirus kit manufactured by bioMérieux (Clermont-Ferrand) or Cepheid’s Xpert EV assay on a SmartCycler (Versailles). The leftover part of each EV-positive CSF samples or RNA extract was stored at -80°C before analysis within 8 days to determine the viral load and genotype (see below).

Data were gathered from medical charts and hospital computer records, using a standardized questionnaire, which

included patients’ clinical history, date and time of admission, and CSF characteristics. Symptom duration was defined as the interval between the onset of symptoms and lumbar puncture. The onset of symptoms was estimated to have occurred at 8 AM, 2 PM, 8 PM, and 2 AM when it was recorded in the morning, the afternoon, the evening, and at night, respectively. Pleocytosis was defined as a CSF white blood cell (WBC) count of >19 cells/ mm^3 for patients aged ≤ 28 days and as ≥ 10 cells/ mm^3 for older patients [20]. CSF protein concentration was classified as normal if it was ≤ 0.9 g/L for newborns <30 days old and ≤ 0.45 g/L for older patients.

Viral Load Determination

Viral RNA was extracted from 200 μL of CSF by a NucliSens EasyMAG extractor (bioMérieux) and eluted in 25 μL of elution buffer. Internal control was added before the extraction step, and quantification of the EV genome was performed with our in-house real-time RT-PCR assay, developed on the Rotor-Gene 6000 (Qiagen) [19]. The lowest concentration of viral RNA quantified with $\geq 90\%$ probability is 15 copies/ μL (95% confidence interval [CI], 10–20 copies/ μL), equivalent to 1875 copies/mL ($3.3 \log_{10}$ copies/mL). The absence of PCR inhibitors in all CSF specimens tested was indicated by the effective amplification of internal control.

Enterovirus Genotyping and Phylogenetic Analysis

Enterovirus strains were genotyped by nucleotide sequencing of viral genes encoding the VP4/VP2 and VP1 capsid proteins with our previously described method [21]. Viral RNA extracted from clinical specimens (throat, plasma, or CSF) was used for complementary DNA synthesis, followed by gene amplification. The nucleotide sequences of PCR products were determined, and the VP1 sequences were deposited in GenBank under the accession numbers HG793656–785. The sequences were used to identify the EV strain in each patient as described earlier [21]. We generated a data set by aligning the VP1 sequences determined in 130 patients to the reference sequences of 17 EV-B genotypes. The time origin of virus lineages was analyzed in a Bayesian statistical framework with a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method implemented in the BEAST program, version 1.7.5 [22, 23] using previously described approaches [24]. The general-time-reversible model with an invariant class of nucleotide substitution and a gamma distribution of substitution rates was used to estimate nucleotide substitutions. The Bayesian skyline model [24] was used as tree prior under a relaxed molecular clock model as described earlier [25]. MCMC analyses were run for 60 million generations, sampling a tree every 3000 steps. A maximum clade credibility (MCC) tree was produced with the TreeAnnotator and FigTree programs (available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator> and <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, respectively). Statistical support for the tree nodes was assessed by their posterior

probability. Time to the most recent common ancestor (tMRCA) at each node in the phylogeny was calculated from the median height parameter in the MCC tree. Statistical uncertainty in the tMRCA calculations was estimated as a 95% highest posterior density (HPD) interval.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Stata software, version 12 (StataCorp, College Station, TX). The tests were 2-sided, with a type I error set at an α level of 0.05. The characteristics of patients were presented as the mean \pm standard deviation or the median and interquartile range (IQR) for each age group, for continuous data, and as the number of patients and associated percentages, for categorical parameters. Viral loads, expressed in genome copies per milliliter, were log-transformed to base 10 for these analyses. Comparisons between groups were analyzed with the χ^2 or Fisher exact test, for categorical variables, followed by the Marascuilo procedure, and with analysis of variance or the Kruskal-Wallis test, for quantitative variables (normality verified by the Shapiro-Wilk test and evaluated for homoscedasticity by the Bartlett test), followed by an appropriate post hoc multiple comparisons test (ie, the Tukey-Kramer or Dunn test). Relations between quantitative parameters were explored by correlation coefficients (ie, Pearson or Spearman coefficients). A linear regression model (with EV load as the dependent variable) was considered in multivariate situation by backward and forward stepwise for the factors considered significant in univariate analysis (entry in the model for $P < .1$) and according to relevant biological and clinical parameters, such as red blood cell (RBC) count, protein level in the CSF, and duration of symptoms (adjustment factors). The interactions between factors were tested. Results were expressed as regression coefficients and 95% CIs. To investigate possible bias caused by a traumatic tap during lumbar puncture, we also calculated the WBC counts and protein concentrations by subtracting 1 WBC for every 500–1000 RBCs in the CSF and 0.01 g/L protein for every 1000 RBCs/mm³ [26]. The results obtained with the 2 methods were comparable.

RESULTS

Relationship Between CSF Viral Loads and Clinical and Biological Characteristics

The viral loads determined in 156 sequential patients with EV meningitis ranged between 3.4 and 7.5 with a median of 4.9 log₁₀ copies/mL of CSF (IQR, 4.3–5.4 log₁₀ copies/mL). The median CSF viral loads were significantly different between age groups ($P = .02$; Figure 1A). Viral loads in neonates (5.4 log₁₀ copies/mL) were higher than those in infants (4.4 log₁₀ copies/mL; $P = .007$) and children (4.7 log₁₀ copies/mL; $P = .01$) but were not different from viral loads in adults (5.0 log₁₀ copies/mL). There was no relation between CSF viral

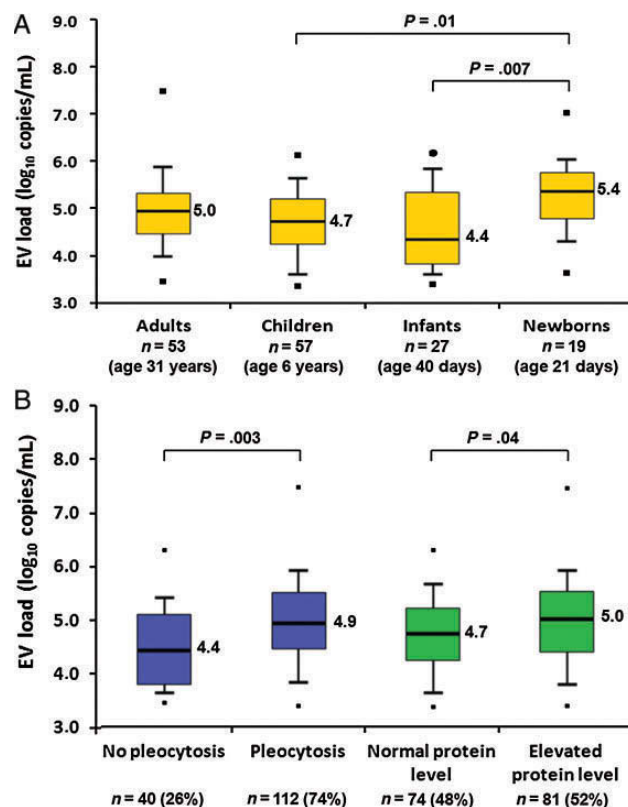


Figure 1. Enterovirus (EV) cerebrospinal fluid (CSF) RNA levels in the study population ($n = 156$) of patients with laboratory-confirmed meningitis. The box plots represent CSF viral loads stratified by age group (A) and pleocytosis or protein levels in the CSF specimens (B). Results are reported as medians (horizontal lines in boxes; values are indicated in the figure), interquartile ranges (top and bottom edges of boxes), and the first and ninth decile (small horizontal lines extended below and above the boxes). Points represent the lowest and highest values. Only statistically significant differences are displayed.

loads and fever, headache, and stiff neck, but the EV RNA levels were elevated in 13 patients (mainly adults) with vertigo and paresthesia (5.1 vs 4.8 log₁₀ copies/mL; $P = .03$; [Supplementary Table 1](#)).

A relationship was observed between viral loads and the number of leukocytes and the concentration of proteins in CSF (Figure 1B). Pleocytosis (median WBC count, 100 cells/mm³; range, 10–1600 cells/mm³) was present in 112 of 152 patients (74%). WBC count differed between age groups ($P < .01$). The median values in adults, children, infants, and neonates were 82, 97, 4, and 6 cells/mm³, respectively. WBC count was not performed in 4 patients (3 neonates and 1 infant) because of the presence of a coagulum. The median WBC counts in CSF with pleocytosis did not differ between age groups (100 cells/mm³; $P = .58$). Pleocytosis was not observed in 11 of 16 newborns (69%), 16 of 26 infants (62%), 4 of 57 children (7%), and 9 of 53 adults (17%). The viral loads were higher in the presence of pleocytosis (median, 4.9 log₁₀ copies/mL) than in

the absence of pleocytosis ($4.4 \log_{10}$ copies/mL; $P = .003$) (Figure 1B). This difference was observed in adults (5.0 vs $4.2 \log_{10}$ copies/mL; $P = .003$) and newborns (5.8 vs $4.9 \log_{10}$ copies/mL; $P = .04$), but not in children and infants, owing to the effects of sampling size. Among the 40 patients with pleocytosis who were admitted within the first 24 hours of illness, 25 (62%) had a CSF neutrophil percentage of $>55\%$ and a median CSF viral load of $5.05 \log_{10}$ copies/mL. The other 15 patients had a viral load of $4.40 \log_{10}$ copies/mL ($P = .07$). Among the 69 patients admitted later, 39 (57%) had lymphocyte percentage of 55% and a viral load of $4.91 \log_{10}$ copies/mL. The other 30 patients had a viral load of $4.95 \log_{10}$ copies/mL ($P = .68$).

CSF protein concentration was high in 81 of 155 patients (52%) and was higher in adults (0.59 g/L) than in children (0.36 g/L; $P < .001$) and infants (0.51 g/L; $P = .03$). The viral load was higher in patients with elevated protein concentrations ($5.0 \log_{10}$ copies/mL) than in those with normal protein level ($4.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .04$; Figure 1B). The protein levels were higher when pleocytosis was present ($P = .04$), particularly among adults.

Relationship of Viral Load, Age, and Pleocytosis With Symptom Duration

There was a difference in symptom duration before lumbar puncture between the age groups (Figure 2): it was shorter in neonates (0.8 days) and infants (0.7 days) than in children (1.2 days; $P \leq .008$ for both comparisons, compared with neonates and infants) and adults (1.3 days; $P < .001$, compared with neonates and infants). Although there was no relationship between symptom duration and viral load ($R = .12$; $P = .14$), the patients who had CSF pleocytosis also had a longer symptom duration (1.2 vs 0.8 days; $P = .001$).

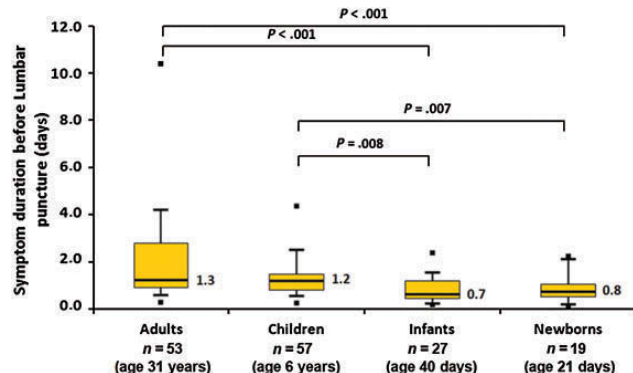


Figure 2. Number of days between the onset of symptoms and the lumbar puncture after patient's admission to the hospital. The symptom duration is represented as box plots and compared between age groups. Results are reported as medians (horizontal lines in boxes; values are indicated in the figure), interquartile ranges (top and bottom edges of boxes), and the first and ninth decile (small horizontal lines extended below and above the boxes). Points represent the lowest and highest values. Only statistically significant differences are displayed.

A multivariate analysis that adjusted for RBC count, protein level in the CSF, and duration of symptoms confirmed that patient age and CSF pleocytosis were related to CSF viral loads, but symptoms of vertigo and paresthesia were not (Table 1).

Relationships Between CSF Viral Loads and EV Genotypes

EV strains were genotyped with viral sequences VP4/VP2 (16 patients) or VP1 (136 patients) (Supplementary Figure 1). In 4 patients, it was not possible to identify EV strains because of low CSF viral loads. The 7 most frequent EV genotypes belonged to the EV-B species: echovirus (E) genotypes 30 (37%), 6 (13%), 11 (8%), and 18 (7%) and CV genotypes A9 (6%), B5 (4%), and B4 (3%). An array of 12 other EV-B and 4 EV-A genotypes was found in 19% of patients. The EV genotypes were distributed differently among the age groups (Figure 3A–D). Meningitis in young adults was caused by E30 (57% of cases), E6 (9%), CVA9 (9%), and E18 (7%). E6 and E30 genotypes were also the main causes of meningitis in children (25 and 39%, respectively), followed by E11 and CVB5 genotypes (5% each).

Table 1. Multivariate Analysis of Variables Associated With Enterovirus Load in the Cerebrospinal Fluid (CSF) of Patients With Meningitis

Characteristic	Regression Coefficient (95% CI)	P
Patient group		
Children	Reference	
Adults	−0.046 (−.39 to .30)	NS
Infants	−0.027 (−.5 to .45)	NS
Newborns	0.77 (.24–1.3)	.005
CSF data		
Samples with pleocytosis	Reference	
Samples without pleocytosis	−0.48 (−.86 to −.1)	.015
Clinical signs		
Absence of vertigo and paresthesia ^a	Reference	
Presence of vertigo and paresthesia	0.44 (−.16 to .89)	.058
Enterovirus genotypes		
E6	Reference	
E30	0.54 (.16–.91)	.005
CVA9	0.96 (.39–1.54)	.001
CVB4	1.16 (.45–1.88)	.002
CVB5	0.44 (−.22 to 1.09)	NS
E11	0.23 (−.36 to .82)	NS
E18	0.47 (−.1 to 1.04)	NS

Results of multivariate regression analysis that adjusted for red blood cells count, protein levels in the CSF, and duration of symptom (sampling time). P values of $<.05$ were considered statistically significant.

Abbreviations: CI, confidence interval; CV, coxsackievirus; E, echovirus; NS, not significant.

^a Among clinical symptoms of meningitis, only vertigo and paresthesia were considered significant in the univariate analysis and included in the multivariate analysis.

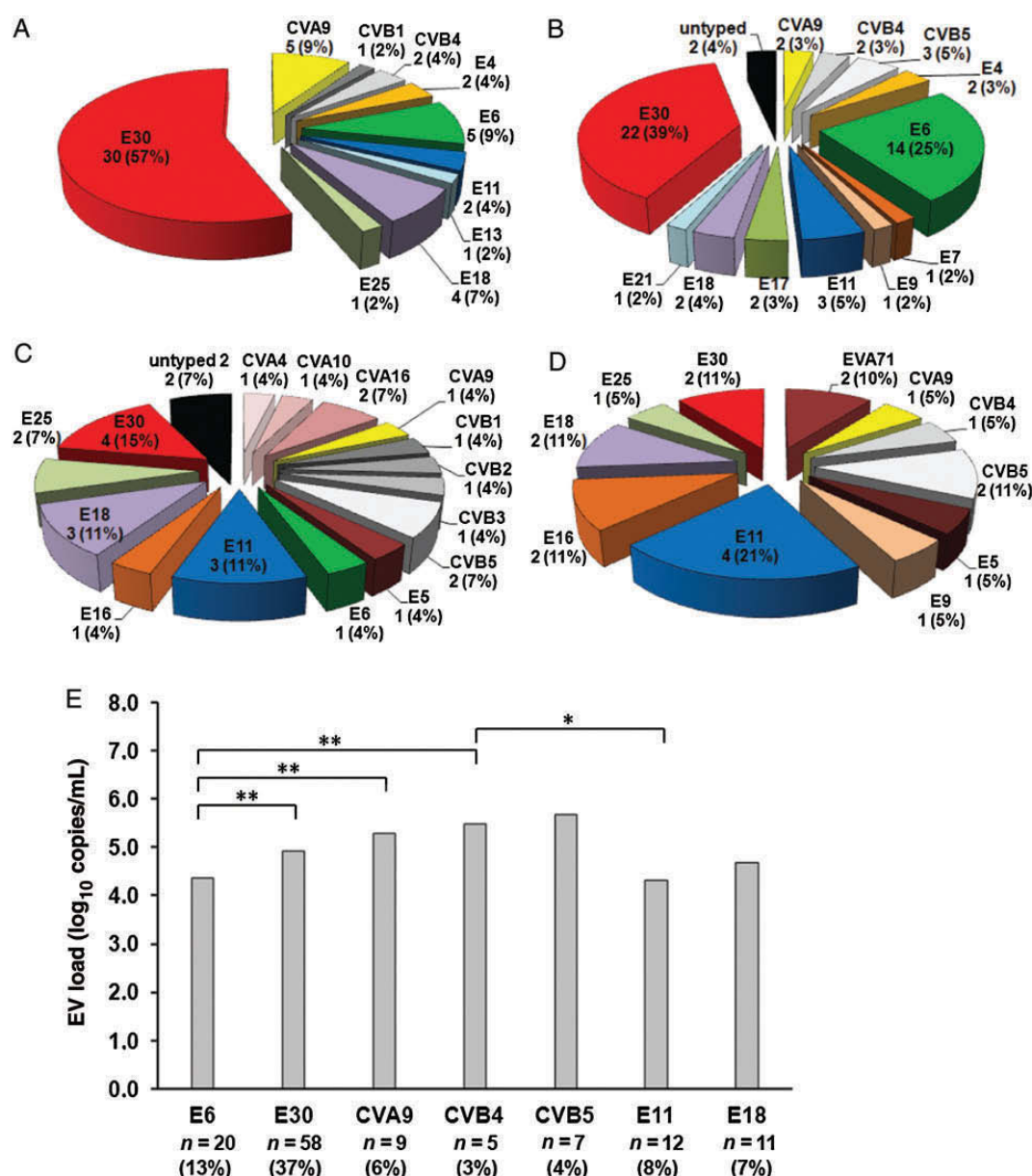


Figure 3. Comparison of cerebrospinal fluid (CSF) viral loads, by enterovirus (EV) genotype. Pie chart distribution of the EV genotypes according to the age of patients, as follows: adults (A), children (B), infants (C), and neonates (D). Data represent the number of patients (percentage), by EV genotype. E, Comparison of viral loads, stratified by EV genotypes. Results are reported as medians. All statistical comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn posttest. * $P < .05$ and ** $P < 0.01$. Abbreviations: CV, coxsackievirus; E, echovirus.

Infants and neonates were infected by a large array of EVs. E30 predominated in infants (15%), followed by E11 and E18 (11% each). In neonates, E11 (21%) was predominant, followed by E18 and CVB5 (11% each). Notably, EV strains assigned to different CV genotypes of the EV-A species (CVA4, A10, and A16, and EVA71) were also found in infants and neonates.

We observed relationships between CSF viral loads and EV genotypes ($P < .001$). Among the 7 most frequent EV genotypes (Figure 3E), the CSF viral loads in E6-infected patients (median, 4.4 log₁₀ copies/mL) were lower than viral loads in patients

infected with E30, CVA9, and CVB4 (4.9, 5.2, and 5.5 log₁₀ copies/mL, respectively; $P < .01$, by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn posttest). Similarly, the CSF viral loads in E11-infected patients (4.3 log₁₀) were lower than those in CVB4-infected patients ($P < .05$, by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post test). Multivariate analysis confirmed that EV genotypes were associated with CSF viral loads (Table 1). E11 and CVB5 mainly infected younger infants (Table 2); E6, E18, and CVB4 were found in children; and CVA9 and E30 were found in adults ($P = .003$). The CSF protein levels differed

Table 2. Variables Associated With Enterovirus Serotypes in Cerebrospinal Fluid Specimens From Patients With Meningitis

Characteristic	Most Frequent Enterovirus Genotype							P
	E6 (n = 20)	E30 (n = 58)	CVA9 (n = 9)	CVB4 (n = 5)	CVB5 (n = 7)	E11 (n = 12)	E18 (n = 11)	
Age, y (d)	6	18	31	12	0.2 (69)	0.1 (45)	5	.003
Proteins concentration, g/L	0.4	0.5	0.6	0.8	0.5	0.6	0.5	.013
Leukocyte count, cells/mm ³	57	66	90	165	783	9	4	.002
Symptom duration, d	1.1	1.2	2.2	1.4	1.2	0.9	1.2	NS

Data are median values. P values of <.05 were considered statistically significant.

Abbreviations: CV, coxsackievirus; E, echovirus; NS, not significant.

between genotypes ($P = .013$): E6-infected patients had lower levels than E11- and CVB4-infected patients, and protein levels were lower in E30-infected patients than in those infected with E11 (Table 2). Differences were also determined between CSF WBC counts and genotypes ($P = .002$): patients infected with CVB5 had a greater number of WBCs than patients infected with the other EV genotypes.

Phylogenetic Clustering and Time Origin of EV-B Strains

The phylogenetic clustering and time origin of lineages corresponding to the 130 virus strains assigned to the EV-B species were estimated with their VP1 sequences (Figure 4A). The Bayesian phylogenetic tree clearly indicated that all patients with E30 meningitis were infected by the same variant. This virus emerged about 6 years before its first detection within the study population (Figure 4B). Similarly, most patients with E6 meningitis were infected by a main virus variant, which emerged in 2008, 3 years before the 2011 outbreak. Two patients with higher viral loads had E6 meningitis caused by genetically distinct virus strains (Figure 4B). The E11 and CVA9 phylogenetic patterns were similar to the E6 pattern: all but 1 or 2 patients were infected by a main virus variant, which arose 2 years before the initial detection in the study population (Figure 4B). In patients with E18 meningitis, 2 variants that emerged in 2002 and 2009 were found with similar frequencies (Figure 4B).

DISCUSSION

This prospective study explored the genotype-specific CSF viral loads in 156 patients of all ages hospitalized with EV meningitis. Our study is the first to provide consistent and evidence-based data suggesting that the EV RNA levels in the CSF of patients with acute meningitis are related to the genotype of the virus strain involved.

Although the exact incidence of EV meningitis is unknown, it is highest among children and young adults [27–29], 2 groups that represented 37% and 34%, respectively, of our study population. In addition, the interval between the onset of symptoms and lumbar puncture was similar in the 2 groups, and the median

CSF viral load was moderate (4.74 and 4.96 log₁₀ copies/mL in children and adults, respectively). A study of a single meningitis epidemic in 2000 caused by EV genotypes E6, E13, and E30 reported a median CSF viral load of 4.5 log₁₀ copies/mL in 61 young patients, mainly children [16]. A decisive finding of our investigation was that >64% of children and adults were infected with the same 2 EV genotypes, E6 and E30, but in different proportions: E6 caused meningitis in 9% of adults and 25% of children, whereas E30 meningitis was seen in 57% of adults and 39% of children. As we also found that CSF viral loads were higher in patients with E30 meningitis than in those with E6 meningitis, we concluded that the amount of virus in the CSF early after the onset of symptoms was mainly determined by viral genotype in the 2 patient groups. Phylogenetic investigations revealed that the E6 and E30 meningitis cases were caused by virus variants that emerged a few years before their involvement in the seasonal epidemics in France in 2009 (E30) and 2011 (E6; Supplementary Figure 2). From the above phylogenetic data, we concluded that the EV RNA levels in the study population may be related to genotypic features, as shown for E30. In contrast, the E6 data suggested that subgenotypic features may be involved in the RNA levels because the 2011 variant was clearly distinct from the E6 viruses identified in earlier seasons [30, 31].

We found that the absence of CSF pleocytosis, as reported in previous studies, was associated with a shorter duration of symptoms in most of the youngest patients [32, 33]. These results indicate that, as suggested by Sato et al [34], in patients admitted when the disease was at an initial stage, the circulating blood leukocytes had not yet infiltrated the CSF compartment. The neonates had higher CSF viral loads than the infants and children but not the adults. In other respects (eg, symptom duration before lumbar puncture and diversity of EV genotypes involved), infections in neonates and infants had similar characteristics. Kawashima et al analyzed the CSF in 21 patients aged 13 days to 11 months and found high viral loads in 4 of 11 neonates and 2 of 10 infants without, however, identifying the virus strains involved [17]. In 24 cases of E9 infections, including neonates and infants, Dalwai et al determined mean

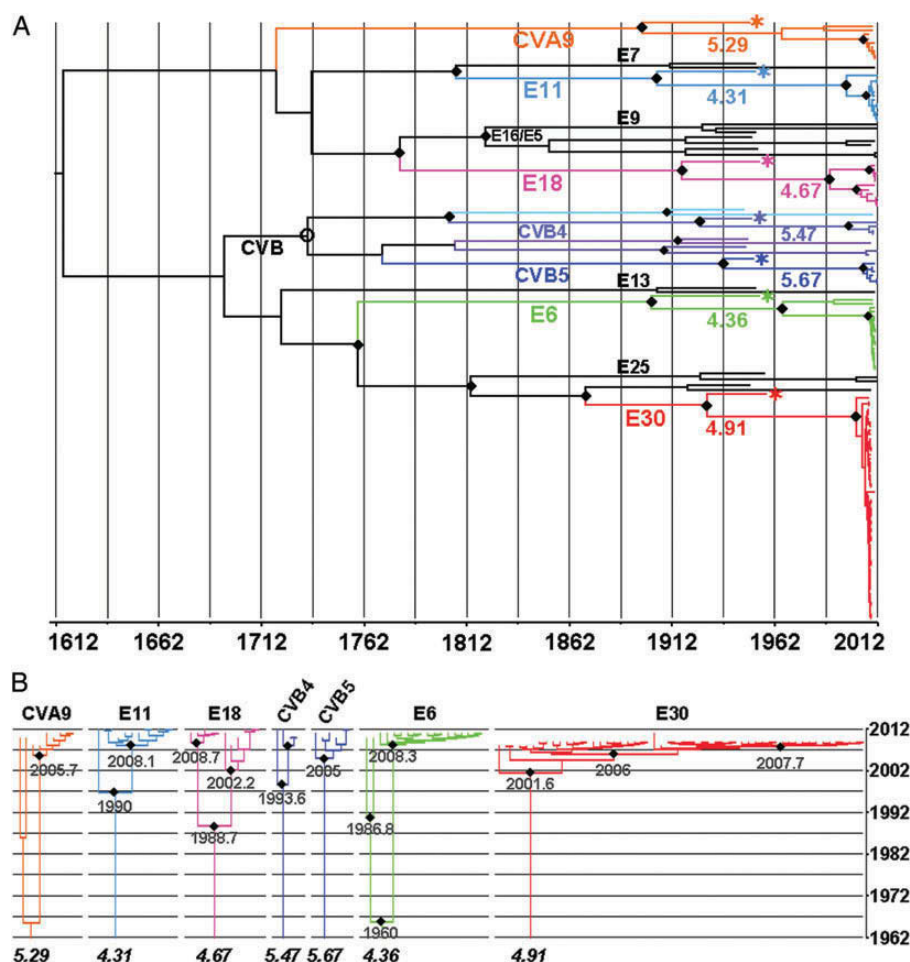


Figure 4. A, Bayesian phylogenetic tree (chronogram) of viral strains identified in 130 patients with meningitis caused by 17 enterovirus (EV) types assigned to the EV-B species. B, Expanded views of the phylogenetic tree, which show the relationships between sequences of coxsackievirus A9 (CVA9), echovirus 11 (E11), E18, CVB4, CVB5, E6, and E30 over the most recent period. Sequences are explicitly dated in calendar years. The chronogram was reconstructed with the viral 1D^{VP1} gene sequences determined in patients and the reference sequences of the 17 EV types. Each tip represents a virus strain in 1 patient. The main EV genotypes encountered in the study population are shown with different colors. Branches labeled with asterisks indicate sequences used as references. For greater clarity, the branches of the other genotypes were shown with black branches, and their reference sequences were not indicated. Statistical consistency of nodes estimated as posterior probability (pp) was indicated by full diamonds (pp > .95) and open circles (pp > .90). In panel A, the values below branches are the median cerebrospinal fluid (CSF) viral loads (in log₁₀ copies of viral RNA/milliliter). In panel B, the time origin (ie, time to the most recent common ancestor) is indicated below each node.

viral loads of 4.0 and 4.6 log₁₀ copies/mL in patients with mild and severe encephalitis, respectively [35]. However, we suggest that the increased viral loads in severe encephalitis cases may have resulted from a higher proportion of neonates in this group. Otherwise, the CSF viral loads in the above studies are consistent with our findings. The neonatal period is marked by a high susceptibility to pathogens, including EVs [36]. The increased susceptibility observed early in childhood was reflected in our study by the large array of 19 EVs with which the neonates and infants were infected. However, since neither genotype was predominant and the 2 patient populations were relatively small, we did not attempt to analyze the distribution of genotypes. Overall, we cannot exclude the possibility

that factors related to younger age were involved in the higher CSF viral loads found in the neonates of our study population, as there is increasing evidence that the homeostasis of innate and adaptive immunity has specific characteristics in the neonatal period [37, 38].

Two other findings were strongly suggestive of a link between EV genotypes and the CSF viral loads in patients with meningitis. First, we found that the highest viral loads were in patients with meningitis caused by CVB4 and CVB5, whereas the lowest were seen in cases of meningitis caused by E6 and E11. We also found that the patients with E11 meningitis were infected by a same variant, which emerged in 2008, 2 years before its first detection in patients, which is consistent with the phylogenetic

data of E6. The second finding is related to meningitis caused by 5 CVB genotypes that form a subgroup within human EVs because they share a common tissue tropism owing to their use of the same cell receptors [39]. In our study population, 16 patients were infected with CVB genotypes, and their CSF was characterized by a higher WBC count than in meningitis cases caused by the other EVs. As CVB genotypes are lymphotropic [40] and lymphocytosis was predominant in these patients, the high CSF viral loads in CVB meningitis might have resulted from infected lymphocytes.

Two salient points emerged from our study. First, we observed that the CSF viral loads were correlated with pleocytosis and protein levels. We showed that there was a link between the absence of pleocytosis and the time at which lumbar puncture was performed, whereas the absence of leukocytes in the CSF of patients with EV meningitis is generally thought to be related to younger age. Second, we found that the highest viral loads were in meningitis caused by EV genotypes such as E30 and CVB, which otherwise had had a high prevalence in hospitalized patients over the previous 10 years. In contrast, 2 variants of E6 and E11 were related to the lowest viral loads and were caused by virus variants that emerged only recently. Overall, we conclude that the differences in CSF viral loads in patients with EV meningitis were related to either the genotype or subgenotype of the involved virus strain. This study raises the important issue of the precise origin in blood of viral RNA detected in the CSF during the early stage of EV meningitis.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank Gwendoline Jugie and Nathalie Rodde, for helpful assistance with virus genotyping; and Jeffrey Watts, for help with preparing the English manuscript.

Disclaimer. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Financial support. This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (grant EA4843).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Stanway GBF, Christian P, Hovi T, et al. Family Picornaviridae. In: Virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Vol. 1. London: Elsevier Press, 2005:757–78.
- Rotbart H. Meningitis and encephalitis. In: Rotbart H, ed. Human enterovirus infections. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1995:271–89.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* 1999; 341:929–35.
- Modlin J. Coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Vol. 2. London: Churchill Livingstone press, 2000:1904–19.
- Dulek DE, Donofrio PD, Sejvar JJ, Edwards KM. Enteroviral meningitis and concurrent peripheral motor axonal polyneuropathy. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:206–8.
- Ihekwa UK, Kudesia G, McKendrick MW. Clinical features of viral meningitis in adults: significant differences in cerebrospinal fluid findings among herpes simplex virus, varicella zoster virus, and enterovirus infections. *Clin Infect Dis* 2008; 47:783–9.
- Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Marttila RJ, Kotilainen P. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid, stool, and serum specimens. *Clin Infect Dis* 2005; 40:982–7.
- Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009; 81:42–8.
- Archimbaud C, Ouchchane L, Mirand A, et al. Improvement of the management of infants, children and adults with a molecular diagnosis of enterovirus meningitis during two observational study periods. *PLoS One* 2013; 8:e68571.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55:1–20.
- Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000–2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:403–12.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:778–90.
- Odom JK, Forrest L, Dunn G, et al. Interruption of poliovirus transmission in Ghana: molecular epidemiology of wild-type 1 poliovirus isolated from 1995 to 2008. *J Infect Dis* 2012; 206:1111–20.
- Aberle SW, Aberle JH, Steininger C, Puchhammer-Stockl E. Quantitative real time PCR detection of Varicella-zoster virus DNA in cerebrospinal fluid in patients with neurological disease. *Med Microbiol Immunol* 2005; 194:7–12.
- Aberle SW, Puchhammer-Stockl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002; 25:S79–85.
- Monpouho S, Coste-Burel M, Costa-Mattioli M, et al. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:532–6.
- Kawashima H, Loi H, Ishii C, et al. Viral loads of cerebrospinal fluid in infants with enterovirus meningitis. *J Clin Lab Anal* 2008; 22:216–9.
- Yen MH, Tsao K, Huang YC, et al. Viral load in blood is correlated with disease severity of neonatal coxsackievirus B3 infection: early diagnosis and predicting disease severity is possible in severe neonatal enterovirus infection. *Clin Infect Dis* 2007; 44:e78–81.
- Volle R, Nourrisson C, Mirand A, et al. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods* 2012; 185:142–8.
- Kestenbaum LA, Ebberson J, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Defining cerebrospinal fluid white blood cell count reference values in neonates and young infants. *Pediatrics* 2010; 125:257–64.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, et al. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2008; 46:87–96.
- Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 2006; 4:e88.

23. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **2007**; 7:214.
24. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* **2005**; 22:1185–92.
25. Henquell C, Mirand A, Richter J. Phylogenetic patterns of human coxsackievirus B5 Arise from population dynamics between two genogroups and reveal evolutionary factors of molecular adaptation and transmission. *J Virol* **2013**; 87:12249–59.
26. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician* **2003**; 15:1103–8.
27. Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull* **2006**; 75–76:1–14.
28. Peigue-Lafeuille H, Croquez N, Laurichesse H, et al. Enterovirus meningitis in adults in 1999–2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol* **2002**; 67:47–53.
29. Lee BE, Chawla R, Langley JM, et al. Paediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of aseptic meningitis. *BMC Infect Dis* **2006**; 6:68.
30. Bailly JL, Mirand A, Henquell C, et al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect Genet Evol* **2009**; 9:699–708.
31. Bailly JL, Mirand A, Henquell C, et al. Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes. *Infect Genet Evol* **2011**; 11:276–89.
32. Mulford WS, Buller RS, Arens MQ, Storch GA. Correlation of cerebrospinal fluid (CSF) cell counts and elevated CSF protein levels with enterovirus reverse transcription-PCR results in pediatric and adult patients. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:4199–203.
33. De Crom SC, van Furth MA, Peeters MF, Rossen JW, Obihara CC. Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis. *Eur J Pediatr* **2012**; 171:795–800.
34. Sato M, Hosoya M, Honzumi K, et al. Cytokine and cellular inflammatory sequence in enteroviral meningitis. *Pediatrics* **2003**; 112:1103–7.
35. Dalwai A, Ahmad S, Pacsa A, Al-Nakib W. Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait. *J Clin Virol* **2009**; 44:48–51.
36. Prendergast AJ, Klennerman P, Goulder PJ. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol* **2012**; 12:636–48.
37. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **2007**; 7:379–90.
38. Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis* **2013**; 26:213–8.
39. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **1997**; 275:1320–3.
40. Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* **1999**; 155:1205–15.

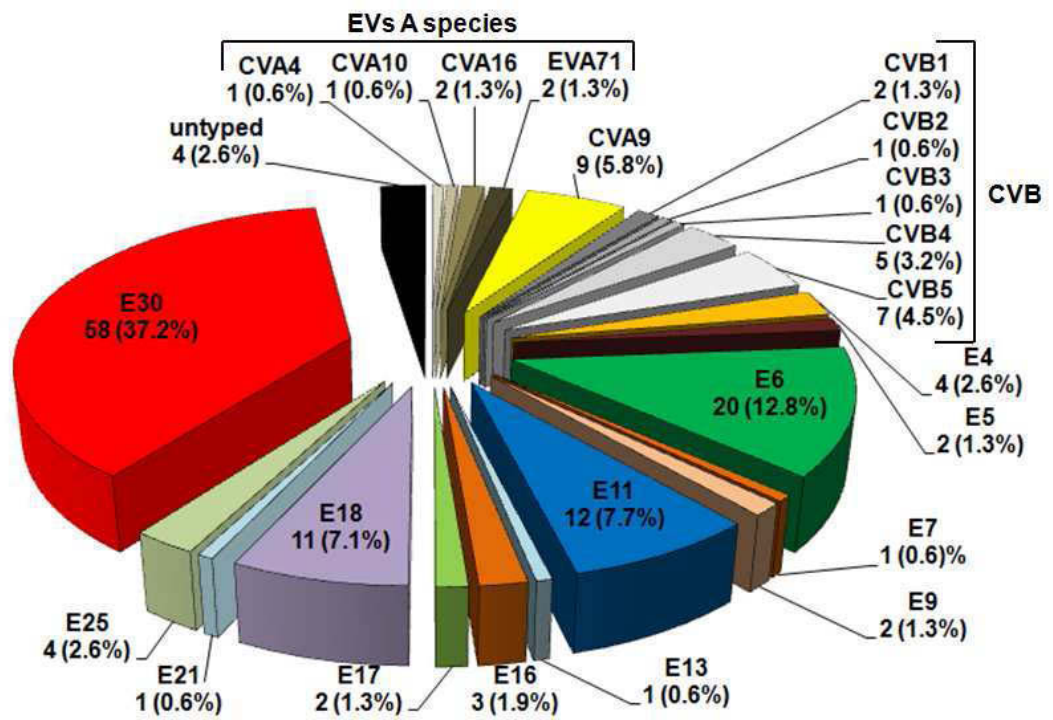
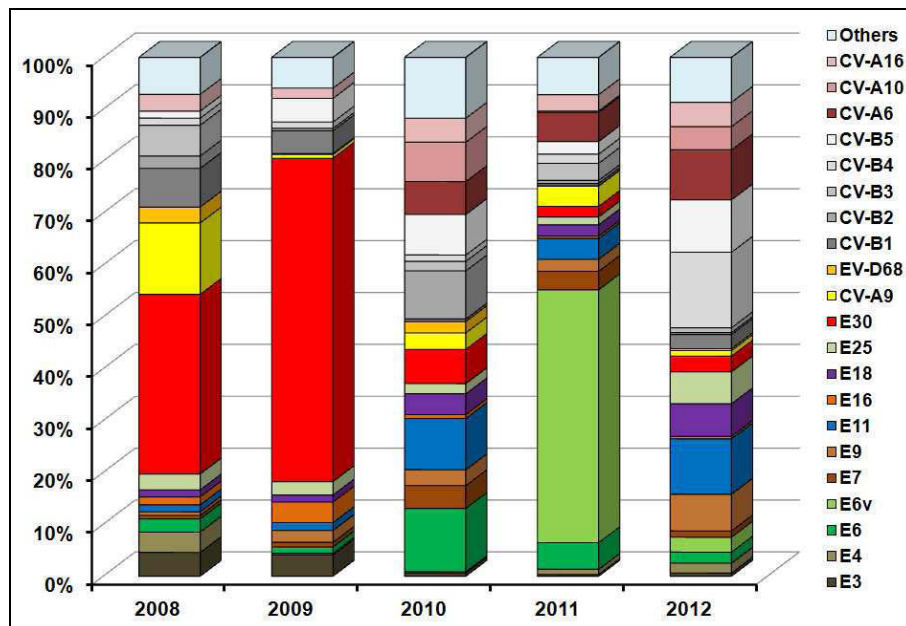


Figure S1. Pie chart distribution of EV genotypes in the whole study population. Data represent the number of patient (percentage) associated to a genotype.

A



B

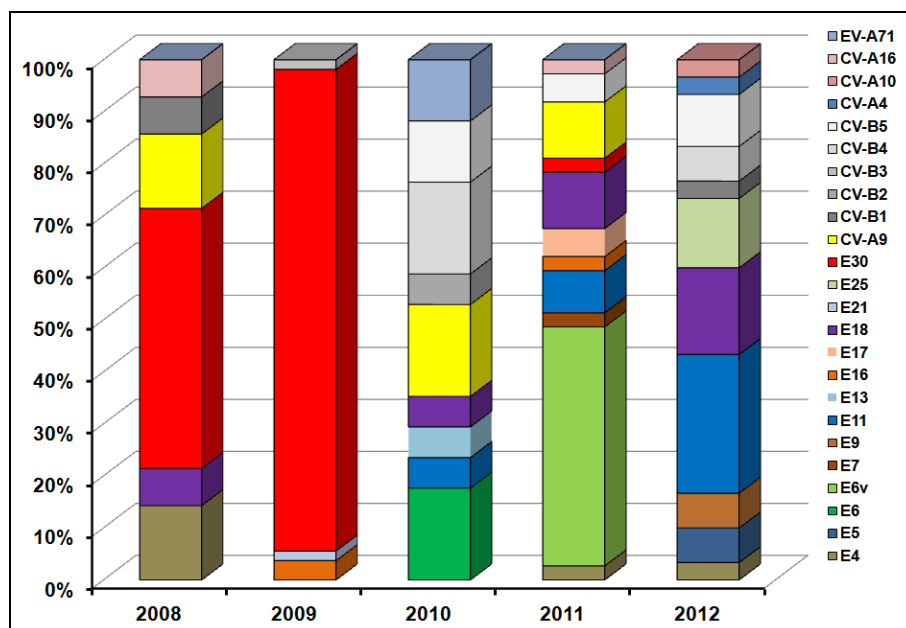


Figure S2. Distribution of EV genotypes from 2008-2012 in France (A) and Clermont-Ferrand (B). The frequencies of EV genotypes were summarized from the data of EV infections in France reported to the National Reference Center for Enteroviruses and Parechoviruses. (<http://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR/Pages/BulletinsInfos.aspx>, accessed 15 November 2013).

TABLE S1. Clinical data on patient admission^a

Characteristic	Newborns (n = 19)	Infants (n =27)	Children (n =57)	Adults (n =53)	P Value
Fever >38°C	18 (95)	27 (100)	51 (89)	44 (83)	ns
Headache	nr	nr	54 (95)	53 (100)	ns
Stiff neck	nr	nr	46 (81)	30 (57)	<0.001
Vomiting	3 (16)	2 (7)	50 (88)	28 (54)	<0.001
Photophobia	nr	nr	25 (44)	38 (72)	0.004
Muscle ache/arthritis	nr	nr	2 (4)	16 (30)	<0.001
Vesicular lesion	1 (5)	2 (7)	1 (2)	0	ns
Angina/rhinopharyngitis	1(5)	9 (33)	6 (11)	9 (17)	0.04
Diarrhea	1(5)	1 (4)	1 (2)	4 (8)	ns
Paresthesia/vertigo	0	3 (11)	1 (2)	9 (17)	0.01

^a Data represent number of patients (%)

Abbreviations: nr, not relevant; ns, not significant (P≥.05)

Title

Differential permissivity of the hCMEC/D3 cell line to a range of neurotropic enteroviruses and specificities of enterovirus 71 in crossing an in vitro model of human blood brain barrier

Authors

Romain Volle¹, Christine Archimbaud^{1,2}, Pierre-Olivier Couraud⁴, Ignacio A. Romero⁵, Babette Weksler⁶, Audrey Mirand^{1,2}, Bruno Pereira³, Cécile Henquell², Hélène Peigue-Lafeuille^{1,2}, and Jean-Luc Bailly^{1,2*}

Affiliations

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EPIE, EA 4843, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²CHU Clermont-Ferrand, Service de Virologie, F-63003 Clermont-Ferrand, France

³CHU Clermont-Ferrand, DRCI, F-63003 Clermont-Ferrand, France

⁴Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

⁵Department of Life, Health and Chemical Sciences, Open University, Milton Keynes, U.K

⁶Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

Running title

Impairment of the blood brain barrier by enteroviruses

Word counts: Abstract, 249; Main text, 5656

Correspondent footnote: Jean-Luc Bailly

Phone: +33 4 73 17 81 42; Fax: +33 4 73 75 48 51; j-luc.bailly@udamail.fr

ABSTRACT

The replication features of 44 enterovirus (EV) types were investigated in an in vitro model of human blood-brain barrier based on cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3 cell line). The cells form a steady polarized barrier when cultured in vitro on a permeable membrane. The permissivity spectrum of hCMECs was investigated to a range of 88 virus strains phylogenetically selected among epidemiologically relevant types of the four enterovirus species A–D. We found that the EV-71 genome is replicated at substantial rates while the infectious virus was released at extremely low but sustained rates at both barrier sides for at least 4 days. Virus antigens were detected in a limited number of cells. The endothelial barrier properties (structure and permeability) were maintained intact throughout the infection. Replication of group B coxsackieviruses (CVB) in hCMECs displayed substantial similarities with that of EV-71. The EV-71 and CVB features were in sharp contrast with the productive infection patterns of fully cytocide meningitis-associated EVs (e.g. echovirus 6 and 30). The hCMEC barriers infected with meningitis-associated EVs were characterized by elevated proportions of apoptotic and necrotic cells. The hallmarks of a picornavirus infection characterized by intracellular rearrangements were also seen: early destruction of the actin cytoskeleton and remodeling of intracellular membranes, all of which resulted in major injuries to the endothelial barriers with dramatic lowering of paracellular permeability and virus crossing to the abluminal side. The infected cells were also characterized by reorganization of the mitochondrion network in a small cluster near the perinuclear space.

INTRODUCTION

Enteroviruses (EVs; Picornaviridae family) involved in human diseases consist in a large group of a hundred (sero)(geno)types, which are assigned to 4 viral species (EV-A to EV-D) on basis of phylogenetic grounds [Stanway et al., 2005]. Each EV genotype includes a number of subgroups hereafter referred to as genogroups. The most vexing acute syndromes caused by EVs in a human host are seen in patients with neurological diseases. Hospital-based surveys and epidemiological investigations indicate that EV infections are related to clinical symptoms of a broad range of illnesses including for instance acute meningitis, encephalitis, cerebellitis, myelitis, and poliomyelitis and that neurological involvement is a rare complication during otherwise widespread EV infections [Antona 2007; Khetsuriani 2006].

The sequential steps, from the initial oral infection by these enteric viruses to the various neurological diseases seen in susceptible individuals, are poorly understood. Our knowledge of the pathogenesis of EV infections caused by the large array of types and genogroups is mainly based on a few EVs, chiefly poliovirus (PV) and coxsackievirus B (CVB), and on experiments in primate and mouse models [Racaniello et al., 2006; Feuer et Whitton 2008]. Two hypotheses prevail for poliomyelitis, the most thoroughly investigated EV disease. The first suggests that PV may transit from the blood to the spinal cord and motor neurons by crossing the blood-brain barrier by a process that is independent of the CD155 receptor [Yang et al., 1997]. Recent experimental data showed that PV type 1 enters human brain microvascular endothelial cells line (hBMEC), an *in vitro* model of blood-brain barrier (BBB), *via* interaction with CD155 receptor [Coyne et al., 2007]. This finding supports the hypothesis of central nervous system (CNS) invasion by BBB crossing. In the second hypothesis, the virus enters an axon at the neuromuscular junction and is retrogradely transported to the spinal cord and the brain [Ren et Racaniello 1992]. The presence of the virus in the vascular compartment (or viremia) has been a long observed feature of EV

infections by isolating the virus directly from the blood, but its role in virus delivery to the CNS has received scant attention. EVs are the most common identifiable cause of acute meningitis, a syndrome marked by an inflammatory process limited to the subarachnoid space and the presence of virus in the cerebrospinal fluid (CSF) [Chadwick 2006]. Acute EV meningitis is a self-limiting disease of children and adults also characterized by CSF pleocytosis, an increase in the number of leukocytes. The brain can be directly involved in the inflammatory process and the encephalitis signs are seen with several EV types, in particular with EV-71, a virus involved in hand-foot and mouth disease, poliomyelitis-like manifestations, and cardio-pulmonary disease [Chen et al., 2007a; Ho et al., 1999]. Notably, EV-71 is subject to retrograde axonal transport in a mouse model [Chen et al., 2007b].

Thus, in the absence of clinical evidence of muscle involvement for the vast majority of EV infections associated with meningitis or encephalitis, viruses are thought to enter the subarachnoid space and the brain parenchyma by crossing the blood-CSF or blood-brain barriers. Experimental data on the susceptibility of human endothelium to EVs were mainly obtained with primary cultures of non-polarized human umbilical vein endothelium cells (HUVECs) [Conaldi et al., 1997; Ylipaasto et al., 2010]. In contrast, microvascular endothelial cell types have been used, to our knowledge, in six earlier studies. Virus persistence was shown for CVB types 3 and 4 in immortalized cells of the human dermal microvascular endothelium [Zanone et al., 2003]. The use of an immortalized cell line of human brain microvascular endothelial cells (hBMECs) showed that their susceptibility to PV1 was accompanied by a rapid increase in paracellular permeability and the activation of a protein tyrosine phosphatase SHP-2 early during virus replication [Coyne et al., 2007]. The susceptibility of the same cell line to CVB3 was also analyzed [Bozym et al., 2010]. The studies indicated that virus entry induces marked activation of Ca^{++} -mediated signaling events after virus binding to CD55 receptor (Decay accelerating factor, DAF) and highlighted the

specific differences in the intracellular signaling pathways in hBMECs between CVB3 and PV1.

We used the human cerebral microvessel endothelial cell line D3 (hCMEC/D3) as a model of BBB [Weksler et al., 2005]. The cells have been widely used as a model for investigating host pathogen interaction [Weksler et al., 2013] but the interaction with EVs has never been analyzed. We examined the permissivity of the hCMEC/D3 cell line to 44 EV types, some of which are widespread epidemic EVs, EV71 and echoviruses 6 and 30 (E6, E30). The cells were sensitive to most EVs tested but displayed major variations in their permissivity, which points to a variety of BBB crossing patterns among the large array of otherwise genetically closely related EV genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and viruses. The hCMECs were grown in EBM-2 basal medium (Lonza) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (PAA), 1% penicillin/streptomycin (PAA), 1% chemically defined lipid concentrate (Invitrogen), 10 mM of HEPES (PAA), 1.4 μ M of hydrocortisone (Sigma Aldrich), 1.5 μ g \times ml⁻¹ of ascorbic acid (Sigma Aldrich), and 200 ng \times ml⁻¹ of basal fibroblast growth factor (Sigma Aldrich). The cells were seeded on rat collagen I-coated culture surfaces (RD-System). The rhabdomyosarcoma (RD) cells were grown in the RPMI 1640 medium (Lonza) with 1% penicillin/streptomycin, and 4% FBS. The buccal epithelial carcinoma cells (KB) cells were grown in DMEM basal medium (PAA) with 1% penicillin/streptomycin, and 6% FBS. All cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

A sample of 88 EV strains, comprising 23 reference strains and 65 clinical isolates, recovered from patient specimens (CSF, Stool or Throat) was used in the study (**Table S1**). Virus stocks were prepared with KB (coxsackievirus B) and RD cells (other EVs) and stored at -20°C. Titration of viral suspensions was done using our end point dilution assay [**Bailly et al., 1991**]. In all experiments, viral *inocula* were prepared in serum-free EBM-2 medium and used at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 1 h at 37°C. Infected cells were then washed with PBS and incubated for the indicated times.

Extraction of nucleic acids and EV real-time RT-qPCR. Whole nucleic acids were extracted from 200 μ l from supernatants or the whole cells and supernatant using the NucliSens® EasyMAG™ extractor (bioMérieux) and were eluted with 25 μ l of the elution buffer provided by the manufacturer. Internal control (IC) was added during the extraction step. Quantification of the EV genome was performed with our in-house RT-qPCR assay developed on the Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen) [**Volle et al., 2012**].

Viability of infected HCMEC/D3 cells. HCMECs were grown in a collagen-coated 12-well culture plate (PAA) and separately infected 24 hours by 15 EV strains. After two washes with Ca^{2+} and Mg^{2+} -free PBS, they were detached with a solution (3:1) of Accutase (PAA) and Trypsin/Versene (Eurobio) for 5 min at 37°C. Detached cells were harvested, centrifuged for 10 min at 1000g, and tested for viability, apoptosis, and necrosis with the Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (Promokine) according to instructions. After staining, cells were washed with the provided kit buffer and analyzed by flow cytometry (BD-LSRII, BD Bioscience). Cells were considered as being viable when they were only stained with the Hoechst compound, apoptotic when they were only stained with the Annexin V conjugated antibody, or necrotic when they were stained with both Annexin V conjugated antibody and ethidium homodimere III. Cell fragments were detected through ethidium homodimere III staining alone.

Fluorescent microscopy. HCMECs grown on collagen-coated chamber slides were separately infected for 6 hours by 50 EV strains and then, they were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min. For mitochondria staining, cells were incubated at 37°C for 1 h before fixation, with complete EBM-2 medium containing 50 nM of MitoTracker® Mitochondrion-Selective probe M7510 (Invitrogen) in humidified atmosphere of 5% CO_2 . Fixed cells were permeabilized with 0.5% Triton X100 for 5 min and then incubated 10 min in a PBS solution containing 5% bovine serum albumin for saturating non-specific sites. Cells were washed with PBS at the end of each step. They were then incubated overnight at 4°C in a solution of mouse primary monoclonal antibodies against the EV VP1 capsid protein (Diagnostic Hybrid). After three PBS washes, incubation was pursued for 1 h at 37°C in a solution of anti-mouse secondary antibodies conjugated to Dye light 488 (Anticorps enligne). In the tests for which active mitochondria staining were not required, red-phalloïdin used for actin staining was included in the secondary antibody solution. After three PBS

washes, nuclear DNA was stained with a Hoechst solution (Promokine) for 5 min at room temperature. The slides were dried, mounted with cover slips, and observed with an epifluorescence microscope (Olympus BX41) or scanning confocal microscope (LSM 510, Carl Zeiss MicroImaging Inc.) equipped with argon (488 nm), HeNe568 (568 nm) and HeNe633 (633 nm) lasers.

EV crossing through an *in vitro* model of brain microvascular endothelial barrier. To obtain microvascular endothelial barriers, hCMECs were cultured at the surface of a permeable membrane (0.4 μ m pore) coated with rat collagen-I placed in the upper chamber of a Tranwell® device (12-well microtiter plate, Corning). The upper chamber was seeded with 45,000 cells and incubated for 5 to 7 days to obtain a tight confluent cell monolayer. In this *in vitro* model, the hCMEC/D3 cells were polarized and displayed a luminal side (at the interface with culture medium) and an abluminal side [Weksler et al., 2005]. Paracellular seal was determined in triplicate tests by measurement of the permeability to Lucifer Yellow (see below). The luminal sides of non-permeable barriers were exposed separately to various EV strains (EV-71/CF166105-10, EV-71/CF160019-10, E-6/CF2660-01, E-11/CF226048-07, E-12/CF1157-91, and E-30/CF2575-00) as described above. The cells were incubated for the indicated times and the medium in the upper and lower chambers was collected separately. The yield of infectious particles and the total amount of viral genome released through the abluminal side were determined as described above. The permeability of the infected barriers was determined for each time post infection.

Lucifer Yellow permeability assay. The paracellular flux through the *in vitro* barrier was determined by testing the permeability to the Lucifer Yellow marker (LY, Sigma). All the tests were done in triplicate. Briefly, the hCMEC monolayers were washed twice with 500 μ l of collecting buffer consisting of HBSS supplemented with 1% of HEPES and 1% of sodium pyruvate. The LY marker (50 μ M) was then added to the upper chamber. Cells were

incubated at 37°C (in an atmosphere of 5% CO₂ and 100% humidity) in three successive collecting wells, each containing 1.5 ml of collecting buffer, for respectively 10, 15, and 20 min. The LY concentration in the collecting buffer of each well and the stock LY solution were determined by fluorometry. Parallel negative control tests were performed with cell-free collagen-coated culture membranes. All the LY-containing samples were analyzed in black 96-well microtiter plates using a Fluoroskan Ascent FL fluorometer (Thermo Electron Corporation, France) at 485 and 538 nm wavelengths for excitation and emission, respectively.

Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). HCMECs cultured on permeable Transwell® membranes were washed with 0.2M Na cacodylate buffer (NCB; pH 7.4) and fixed overnight at 4°C in 1.6% glutaraldehyde-NCB. The cells were then fixed for 1 h with 1% OsO₄ in NCB. For SEM preparation, cells were dehydrated in graded ethanol, followed by critical point drying with 100% ethanol and hexamethyldisilane (1:1) for 10 min, sputter-coated with gold (JEOL JFC-1300), and observed at 5kV with a JEOL 6060-LV microscope. For TEM preparation, cells were dehydrated in graded ethanol, infiltrated sequentially with three mixtures of ethanol/EPON resin (2:1, 1:1, and 1:2) for 1 h each, embedded in EPON resin overnight at room temperature, and cured 2 days in a 60°C oven. Thin sections (70 nm, UC6 ultramicrotome, leica) were stained with uranyl acetate and Pb citrate, and observed at 80 kV with Hitachi H-7650 microscope. All chemical products were provided by Delta Microscopies.

Image capturing and data Analysis. Confocal observations were made using LSM-510 EXPERT MODE. Contrast and brightness were adjusted using FIJI software. To calculate the number of infected cells by fluorescent microscopy, images were captured (three sites/well) at 10X magnification. Automated image analysis (FIJI) was then used to calculate the total

number of cells (Hoechst staining) and the number of infected cells (staining of the VP1 capsid protein).

Statistical Analysis. Statistical analyzes were conducted with software Stata (version 12, StataCorp, College Station, US). Tests were two-sided, with a type I error set at $\alpha=0.05$. Quantitative data are expressed as mean (and associated standard deviation, Gaussian distribution verified by the Shapiro-Wilk test). Correlated data were analyzed by mixed models to study the evolution of parameters taking into account between and within strain variability (random effects as intercept and slope). The normality of the residuals of all models was studied. These analyses were completed by ANOVA for repeated measures followed by post-hoc Tukey-Kramer test. Multidimensional analysis (principal component analysis in our case) was conducted to explore the relation between several quantitative parameters. Correlation coefficients (Pearson or Spearman when appropriate) were calculated to quantify these relations.

RESULTS

Permissivity of non polarized hCMECs to various EV genotypes. In the initial stage of the study, we used non-polarized hCMECs and investigated the replication of virus strains selected among 37 EV-B genotypes, which represented a large array of epidemiologically frequent and infrequent EVs involved in acute meningitis. The infection patterns of the EV-B genotypes were compared with those of other genotypes: EV-A (n=5), EV-C (n=1), and EV-D (n=1). A schematic of this exploratory analysis is shown in **Fig. S1**. Permissivity of hCMECs to 88 EV strains was assessed at 24 h p.i by measurement of the total production of viral RNA and infectious viruses (**Fig. 1A**). Virus yields ranged from -3.07 to $3.06 \log_{10}$ infectious particles per cell and showed a positive correlation (Spearman's rho 77%, p-value <0.001) with the viral RNA production (range: -1.42 to $6.08 \log_{10}$ genome copies per cell). The virus strains selected among the EV-B genotypes displayed various infection patterns defined by two arbitrarily selected thresholds at $0.00 \log_{10}$ infectious particles and $3.00 \log_{10}$ genomes generated per cell (see **Fig. 1A**). The strains of the infrequent genotypes E-1 and EV-69 and those of the epidemic genotypes E-6, E-11, E-13, and E-30 displayed the highest infectivity in hCMECs. The lowest infectivity was determined for the strains selected among CVB and EV-A genotypes. Two EV-A71 strains within the latter group had the highest infectivity.

Kinetics of viral RNA production were performed to confirm the above observations (**Fig. 1B**). Total viral RNA was quantified by RT-qPCR in the whole supernatant and cells at the indicated times for genotypes EV-A71, E-6, E-30 and E-12. Viral replication reached exponential rate between 2 and 6 h p.i. (p-value 0.001). Different peaks were reached at 24 h p.i according to the virus tested, from the lowest to the highest (mean \pm SD in \log_{10} copies per cell): EV-71 (3.29 ± 0.58), E-30 (4.15 ± 0.30), E-6 (5.30 ± 0.25), and E-12 (5.56 ± 0.21). The RNA genome levels at 24 h p.i. were consistent with those obtained in the experiment shown in **Fig. 1A**: 2.46 ± 0.63 , 3.85 ± 0.26 , 5.02 ± 0.15 , and 5.46 ± 0.15 , respectively.

We determined the number of productively infected hCMECs at 6 h p.i. before extensive release of virus progeny to investigate whether the variation in permissivity were related to differences in the infection efficiencies of EV strains (**Fig. 1C**). The infected cells were numbered with an automated counting method from low magnification pictures obtained with an epifluorescence microscope. The highest proportion of infected cells (>30%) was determined for genotypes E-19, EV-69, and E-1. Intermediate proportions of 10–30% were obtained with the E-12 and E-16 genotypes. Less than 10% of fluorescent cells were counted for virus strains of various genotypes (E-30, E-3, E-7, CV-B6, E-4, E-14, E-18, EV-71, E-9, E-32, CV-B3, and E-25). About 20 infected cells per cm² were counted for genotypes E-27 and E-11, and only 3–5 infected cells per cm² for genotypes EV-70, EV-77, CV-A9, E-15, E-24, and E-26. Two E-6 and E-13 strains exhibited different infection efficiencies (E-6/CF2660-01, >30%; E-6/CF158061-11 and E-13/CF1275-00, 10–30%; E-13/CF1925-01, <10%).

Multidimensional analysis of the EV infectivity in non polarized hCMECs. The mortality rates of infected hCMECs were determined at 24 h p.i. for 15 EV strains (**Fig. 1D**). The mortality threshold was defined by the highest value of the standard deviation calculated with mock infected cells (10%). High mortality rates were found in infections with genotypes E-1 (77.6%) and EV-69 (64.2%), and cell death resulted from both necrosis and apoptosis. Moderately high mortality rates in the range of 40 to 50%, were estimated for E-12 (48.1%) and a number of virus strains among genotypes E-6 (strain CF2660-01, 46.8%) and E-30 (CF282-97, 44.9%). Other virus strains of the two latter genotypes were associated with low mortality rates (40–30%). Two E-13 strains exhibited different cell mortality rates (CF1274-00, 38.3%; CF1925-01, <30%). The only virus with cell mortality rates similar to those of mock infected cells was EV-71 (11%).

We used PCA to visualize on a map the ordination of the 15 EV strains according to four variables: the proportion of infected cells, the production of viral genomes, the yield of infectious particle production, and cell mortality rates, as determined above. The projection of the initial variables in a correlation circle showed that the percentage of infected cells and cell mortality exhibited a positive correlation, hereafter designated cell susceptibility. Similarly, the productions of viral genomes and infectious virus were positively correlated and designated as viral production. As cell susceptibility and viral production were orthogonal, they were not correlated with each other (**Fig. S3**). Cell susceptibility was linked to the horizontal axis and viral production to the vertical axis. PCA confirmed that hCMECs displayed large differences in susceptibility to EV genotypes and strains within a same genotype (**Fig. 2**). The overall investigation of EV infectivity on non-polarized hCMECs as summarized by PCA allowed us to select various viral strains representative of different permissivity patterns.

Permeability variations of endothelial barriers during EV infections. We investigated the relationship between the permeability of endothelial barriers obtained in vitro with polarized hCMECs and the infection by viruses of five EV genotypes (**Fig. 3**). Typical features of a brain microvascular endothelial wall such as a tight and flat confluent cell monolayer with tight junctions were detected with scanning and transmission electron microscopy in our in vitro model (see below **Fig. 4**). Measurements of low clearance rates of the non-permeable fluorescent LY compound indicated consistent restrictive paracellular permeability in uninfected endothelial barriers (**Fig. S4**). Endothelial barriers infected at the luminal side with E-6, E-11, E-12, and E-30 strains exhibited little change in paracellular permeability at 24 h p.i. but afterward they displayed increased permeability (**Fig. 3A–3D**). The permeability to the LY compound of endothelial barriers infected with the EV-A71 strains was unchanged at

24 h p.i. and was maintained at levels not significantly different from those of mock infected barriers until 96 h p.i. (**Fig. 3E and 3F**).

A release of viral genomes ($>6 \log_{10}$ copies) was detected at 6 h p.i. at the abluminal sides of E-6, E-11, E-12, and E-30 infected barriers (**Fig. 3A–4D**), but infectious viruses were detectable below the titration threshold for E-12 and E-30 infections. The total virus release (mean \pm SD in \log_{10}) from E-12 infected endothelial barriers reached maximum values of 8.59 ± 0.10 genome copies and 4.97 ± 0.19 infectious viruses at 24 h p.i., with little variation over the following 24 hours. In E-6 infected barriers, maximum values of $9.39 \pm 0.12 \log_{10}$ genome copies and $6.34 \pm 0.10 \log_{10}$ infectious particles were determined at 24 h p.i., followed by a slow decrease until 72 h p.i. The infection pattern of E-30 infected barriers at 24 h p.i. was characterized by an abluminal release of $8.49 \pm 0.08 \log_{10}$ genome copies and 4.82 ± 0.26 and \log_{10} infectious particles, which was similar to that of E-12. The viral release estimated for the E-11 infected barriers was $9.39 \pm 0.09 \log_{10}$ genome copies and $6.89 \pm 0.23 \log_{10}$ infectious viruses at 48 h p.i., with little variations during the following 24 hours. Two EV-71 strains tested for virus release from endothelial barriers displayed similar features with each other but exhibited completely different patterns with the strains described above. The abluminal release of EV-71 genomes was the highest at 24 h p.i. (7.60 ± 0.45 and $7.0 \pm 0.51 \log_{10}$ genome copies) and remained constant at slightly lower levels until 96 h p.i. Virus was released at 24 h p.i. at levels of 2.34 ± 0.13 and $2.52 \pm 0.47 \log_{10}$ infectious particles while afterward it was detected only below the titration threshold up to 96 h p.i.

Structural integrity of endothelial barriers during EV infection. The barriers obtained with the hCMECs were controlled by SEM to visualize their structure during EV infection and to investigate a possible role of integrity disruption in the abluminal release of virus and in the permeability patterns among EV strains (**Fig. 4**). The endothelial barriers infected with either strain of genotypes E-6, E-30, E-12, and EV-71 were analyzed at 24 h p.i. Three

cytological alterations (rounded up infected cells) were found in infected barriers compared to mock infected controls (**Fig. 4A**). Cells with a characteristic necrotic shape including damage of the plasma membrane were observed in most infected endothelial barriers (see red arrow heads in **Fig. 4D–4O**). Cells with an apoptotic shape (preserved and budded plasma membrane) were also seen in most infected endothelial barriers (see green arrow heads). Rounded cells without apparent altered plasma membrane suggestive of early steps of cell death were also observed in endothelial barriers infected mainly with E-30 (see blue arrow heads). On the basis of these analyses, we found evidence of large proportions of infected cells scattered throughout the endothelial surface during infections with E-6, E-30, and E-12, and breaches within barriers were found around altered cells, as indicated by the visualization of pores of the transwell membrane (see white arrow heads). In contrast, the infected cells were grouped in few foci and a limited number of breaches were produced in the infected barriers during the EV-A71 infection.

Intracellular changes in endothelial barriers during EV infection. The endothelial barriers were analyzed by TEM to visualize the intracellular features of infected hCMECs in the aim of investigating possible variations between EV genotypes and their role in the abluminal release of virus and in the permeability patterns. The altered cells within the endothelial barriers infected with an E-6 virus strain displayed major features indicative of virus infection (**Fig. 5**), which were similar to those resulting from infections with genotypes E-30, and E-12 (data not shown). For instance, at 24 h p.i., the impaired cells within the E-6 infected barriers displayed shrunk nuclei relocated near the cell membrane and contained myriads of virus-induced vesicular-like membranous structures about 200 nm in diameter (**Fig. 5A and 5B**). These structures had either single or double membranes and were organized in arrangements that occupied extensive intra-cellular areas near the nucleus and the plasma membrane (**Fig. 5C**). Some infected cells showed evidence of tubular structures with positive membrane

invagination that enclosed cytoplasmic components (**Fig. 5D**). Highly electron-dense punctuations clustered between membranous structures were suggestive of viral particle aggregates (**Fig. 5E**). Mitochondria were grouped near the arrangements of membranous structures, which contrasted with mock infected cells, in which amounts of mitochondria formed an extensive network occupying large cytoplasm areas (see **Fig. S4**). Large single-membrane vesicles (600–1000 nm in diameter) contained electron-dense material, multiple small components, or multilamellar structures, characteristics suggestive of autophagic vacuoles (**Fig. 5C**).

The impaired cells in endothelial barriers infected with an EV-71 strain (**Fig. 6**) displayed a number of structural variations in comparison with the features of the E-6 infected barriers. The EV-71 infected cells maintained an endothelial elongated shape and contained nuclei similar in shape to those of control barriers (**Fig. 6A to 6D; Fig. S4**). Intracellular remodeling features included vesicular-like structures and mitochondria clustered nearby (**Fig. 6E and 6G**). EV-71-induced membranous structures appeared less electron-dense and had a uniform round shape with a multilamellar structure and a larger diameter of approximately 500 nm (**Fig. 6E to 6I**) in comparison with structures induced by the other EVs.

Patterns of intracellular injuries are common to EVs. We further explored the early virus-induced intracellular injuries in non-polarized hCMECs for five EV genotypes (E-6, E-11, E12, E-30, and EV-71) by confocal microscopy at 4 and 6 h p.i. We investigated the effects of EV infection on the actin cytoskeleton as this network is connected with tight junctions (**Fig. 7**). Replication of the five EVs tested was detected by green fluorescence of the VP1 protein (**Fig. 7A–7O**), and the infected cells displayed major reduction of actin staining in comparison to mock infected cells (**Fig. 7P–7R**). These results indicated dramatic cytoskeleton impairment early after the initiation of viral protein synthesis. Impairment of actin microfilaments bundles was still clearly visible while sub-membrane actin was

maintained in some infected cells (see white arrowheads in **Fig. 7A** and **7D**). When the actin cytoskeleton had completely disappeared, the infected cells rounded up and some of them exhibited multiple filopodia (**Fig. 7E, 7H, 7N, and 7Q**)

Early virus-induced changes in the mitochondrion network were analyzed with a fluorescent probe that accumulates in active mitochondria (**Fig. 8**). Although mitochondria were stained in all virus-infected cells (**Fig. 8A–8O**), the mitochondrion network was completely different from that seen in mock infected controls (**Fig. 8P–8R**). Mitochondria formed a typical network surrounding the nucleus in non-infected cells, but they were densely clustered in a perinuclear area in infected cells, which was consistent with TEM observations. Rearrangement of the mitochondrion network was marked in cells exhibiting prominent staining of the VP1 protein at 6 h p.i (see white arrowheads in **Fig. 8**). In contrast, cells with reduced VP1 staining exhibited no or minor changes in the mitochondrion network (yellow arrowheads in **Fig. 8G and 8J**). Overall, mitochondrion clustering appeared to be dependent on viral replication intensity but was not directly associated with cell rounding.

DISCUSSION

In this study, we showed that the hCMEC/D3 cell line displayed a large permissivity spectrum to human EVs and we found substantial differences between types and genogroups. The comparison of 44 human EV types showed that the hCMEC/D3 cell line can be used as a general cell model to investigate the interaction of the widely diversified EVs with the human microvascular endothelium. Most EV strains occupied a central position in the permissivity spectrum of hCMECs, notably the E-6, E-13, and E-30 strains. The permissivity variations between viruses of a same EV type may be related to viral genetic differences since the strains were selected on phylogenetic grounds among distinct genogroups and subgenogroups. In addition, a wide range of cellular receptors have been described for human EVs [reviewed in **Merilahti et al., 2012**]. Although the binding features of EV strains to hCMECs were not examined in our study, there is a large body of earlier experimental evidence to suggest that the variations in hCMEC permissivity to EVs can be attributed to their propensity for using a wide array of receptors and internalization processes [**Ylipaasto et al., 2010**]. For instance, the E-1 strain Farouk is apart from the other EVs in the hCEMC permissivity spectrum. This pattern may be related to the fact that it is the only known virus to bind integrin $\alpha 2\beta 1$ (also known as VLA-2, Very Late Antigen 2) [**Bergelson et al., 1993**]. The E-12 type displayed a position in the hCEMC permissivity spectrum opposite to that of E-1. A number of EV types examined in our study (E-3, E-6, E-7, E-12 and E-13) were reported to bind the same receptor CD55 (or DAF, Decay accelerating factor) [**Bergelson et al., 1995**]. Yet, the virus strains of these EV types did not cluster in the same area of the hCMEC permissivity spectrum, which suggests that additional factors other than receptors must be involved. This is in agreement with the hypothesis that genogroup features may be involved in the pathophysiology of EV infections.

Our investigation provides evidence of two major clusters among EV types and genogroups. A first cluster consists of the EVs that induce extensive disruption of the endothelium barrier and it comprises viruses with a highly cytocide phenotype. We obtained substantial evidence of full productive infection and complete permissivity with a large range of EV types and genogroups, most of which were echoviruses involved with various frequencies in meningitis outbreaks. Interestingly, early during viral infection (at 6 h p.i.) with the E-6, E-11, E-12 and E30 types, for instance, the release of virus genomes in the abluminal compartment was >10,000 times higher than the release of infectious viruses. We excluded the involvement of paracellular transport of viral RNA and defective virus particles since the barrier permeability was not yet compromised at this time, a conclusion confirmed by direct SEM observations. Accordingly, massive amounts of viral genomes were drained off the cells through their basolateral membrane by a yet unknown process. At a later time point in the infections (≥ 24 h p.i.), the occurrence of infectious viruses at the abluminal side of the hCMEC barriers was a direct result of the increase in paracellular permeability and major injuries to the barriers caused by dying cells. Overall, permissivity patterns of hCEMCs to echovirus types suggest cytocide viral replication in human endothelial barriers in agreement with the inflammatory process of the in vivo infections.

The second cluster comprises CVB and EV-71 types, which produced no impairment of the in vitro model of endothelium barrier. A key observation in the present study, in sharp contrast with the above data, is that hCMECs are characterized by a moderately high permissivity to EV-71 strains of genogroups C1 and C2. This pattern resulted from a substantially high replication rate of the viral genome but a remarkably poor production of infectious viruses. Both the virus and viral RNA were released from the basolateral (abluminal) side of the endothelial barrier but at disproportionately different rates, as the infectious virus was consistently detected at minute amounts. This process was maintained for

at least 4 days, did not induce a breakdown of the barrier nor change the paracellular permeability as measured with the LY surrogate marker. This non-disruptive pattern occurred even when the barriers were inoculated with a MOI of about 100 TCID₅₀ per cell (data not shown), which suggests that it was not dependent on the initial infection conditions but was more probably related to post-entry factors. A non-disruptive and long-term replication pattern was also a hallmark of the hCMEC infection by CV-B3 and CV-B5 (data not shown). Notably, a persistent replication pattern was reported earlier for CV-B3 and CV-B4 in human dermal microvascular endothelial cells [Zanone et al., 2003].

The analysis of the ultrastructure of infected cells showed typical features of picornavirus infections. We found evidence of both apoptosis and necrosis among infected cells whatever the EV genotype involved not only by using cell-sorting analysis but also with SEM investigations. This is consistent with earlier data indicating a competition between both cell death pathways and the viral replication cycle [Agol et Gmyl 2010]. Although we did not provide a relation between the two processes, we also showed the disruption of the actin cytoskeleton network and that of tight junctions as observed by rounding of infected cells. The link between actin cytoskeleton and tight junctions has an important role in the maintenance of stable inter endothelial junctions and prevent paracellular transport to the brain [Stamatovic et al., 2008; Spindler et Hsu 2012]. Similar data obtained reproducibly for different EV types indicated that disruption of the actin cytoskeleton was an early feature (at least from 4h p.i.) during the infectious cycle, observed well before rounding of hCMECs. Remodeling of intracytoplasmic membranes was the third hallmark of a picornavirus infection in infected hCMECs but discrete variations were determined between the infections with three echoviruses (E-6 E-12, and E-30) and the EV-71 infection. In the echovirus infections, we found evidence of both single and double membrane vesicles organized in compact structures near the nucleus and of tubular structures which displayed positive membrane invagination.

These features were also observed in CV-B3 and PV-1 infections [Limpens et al., 2011; Belov et al., 2012]. The vesicular structure in the EV-71 infected hCMECs was characterized by less condensed vesicles and an increased proportion of multilamellar and large vesicles. Finally, our observations with both TEM and fluorescence microscopy showed clustering of the mitochondrion network, a previously unobserved feature of EV infections. This phenomenon occurred early during the virus infection and its origin is still unclear. It may be related to virus-induced disruption of microtubules, as suggested for cells infected with the hepatitis B virus [Kim et al., 2007]. A similar feature was also reported for another DNA virus, African swine fever virus, and was related to coupling between viral translation and ATP synthesis [Rojo et al., 1998].

During a natural EV infection, virus particles and virus infected leukocytes are released in the bloodstream from which they may cross the BBB. The inflammatory process and brain involvement of EV infections indicate the occurrence of interactions with the BBB. Our overall results indicate that all epidemiologically important EVs may interact with human microvascular endothelial barriers but that CVB and EV-71 are distinctively different from the other types. The transendothelial crossing pattern is established here for the first time for EV-71. Whether the infection of our in vitro model of human endothelial barrier reflects the stage by which the virus spread to the CNS in vivo remains to be determined. Is there supporting evidence that endothelial cells are actual in-vivo targets of EV-71 infections in human diseases, particularly those associated with neurological conditions? There is no clear evidence to indicate this but our data point to the interesting hypothesis that virus antigens may not be easily detectable in the endothelium of infected patients because of a low production of virus antigens in infected hCMECs and its persistent-like mode of replication.

AKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the technical contribution of Gwendoline Jugie, Nathalie Rodde, and Isabelle Simon for helpful assistance in virus culture and sequencing. We thank Mr. Jeffrey Watts for help with preparing the English manuscript. Fluorescence confocal microscopy observations were done at ICCF, Imagerie Confocale de Clermont-Ferrand (France). TEM and SEM observations were done at the Centre d’Imagerie Cellulaire Santé (Clermont-Ferrand, France).

REFERENCE

- Agol VI, Gmyl AP. 2010. Viral security proteins: counteracting host defences. *Nat Rev Microbiol.* 8(12):867-78.
- Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B. 2007. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26(6):403-12.
- Antona 2003
- Bailly JL, Chambon M, Peigue-Lafeuille H, Laveran H, De Champs C, Beytout D. 1991. Activity of glutaraldehyde at low concentrations (less than 2%) against poliovirus and its relevance to gastrointestinal endoscope disinfection procedures. *Appl Environ Microbiol.* 57(4):1156-60.
- Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol.* 86(1):302-12.
- Bergelson JM., Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW. 1995. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *PNAS.* 91(13):6245-48.
- Bergelson JM, St John N, Kawaguchi S, Chan M, Stubdal H, Modlin J, Finberg RW. 1993. Infection by Echoviruses 1 and 8 Depends on the cx2 Subunit of Human VLA-2. *J Virol.* 67(11):6847-52.
- Bozym RA, Morosky SA, Kim KS, Cherry S, Coyne CB. 2010. Release of intracellular calcium stores facilitates coxsackievirus entry into polarized endothelial cells. *PLoS Pathog.* 6(10).
- Chadwick DR. 2006. Viral meningitis. *British Medical Bulletin.* 75-76:1-14.
- Chen KT, Chang HL, Wang ST, Cheng YT, Yang JY. 2007a. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics.* 120(2):e244-52.
- Chen CS, Yao YC, Lin SC, Lee YP., Wang YF, Wang JR, Liu CC, Lei HY, Yu CK. 2007b. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J Virol.* 81(17):8996-9003.
- Coyne CB, Kim KS, Bergelson JM. 2007. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *EMBO J.* 26(17):4016-28.
- Feuer R, Whitton JL. 2008. Preferential coxsackievirus replication in proliferating/activated cells: implications for virus tropism, persistence, and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 323:149-73.
- Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011. 37(1):24-39.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. 1999. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med.* 341(13):929-35.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberste S, Pallansch MA; Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *MMWR Surveill. Summ.* 55:1-20.
- Kim S, Kim HY, Lee S, Kim SW, Sohn S, Kim K, Cho H. 2007. Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners. *Journal of Virology.* 81(4):1714-26.
- Limpens RW, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder, EJ, van Kuppeveld FJ, Bárcena M. 2011. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio.* 2(5).
- Merilahti P, Koskinen S, Heikkilä O, Karelehto E, Susi P. 2012. Endocytosis of integrin-binding human picornaviruses. *Adv Virol.* 2012:547530.
- Racaniello VR. 2006. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 344:9-16.

Ren R, Racaniello V R. 1992. Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *The Journal of Infectious Diseases*. 166(4):747-52.

Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Viñuela E, Cuezva JM, Salas J. 1998. Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *Journal of Virology*. 72(9):7583-8.

Spindler KR, Hsu TH. 2012. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology*. 20(6):282-90.

Stamatovic SM, Sladojevic N, Keep RF, Andjelkovic AV. 2012. Relocalization of junctional adhesion molecule A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology*. 32(17):3414-27.

Stanway G, Brown P, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, King NJ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pallansch MA, Palmemberg AC, Skern T. 2005. Family Picornaviridae, p 757–778. In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (ed), *Virus Taxonomy*. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press.

Volle R, Nourrisson C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C. 2012. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods*. 185(1):142-8.

Weksler B, Romero IA, Couraud PO. 2013. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*. 10(1):16.

Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB Journal*. 19(13):1872-4.

Yang WX, Terasaki T, Shiroki K, Ohka S, Aoki J, Tanabe S, Nomura T, Terada E, Sugiyama Y, Nomoto A. 1997. Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology*. 229(2):421-8.

Ylipaasto P, Eskelinen M, Salmela K, Hovi T, Roivainen M. 2010. Vitronectin receptors, α_v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *Journal of General Virology*. 91(1):155-65.

Zanone MM, Favaro E, Conaldi PG, Greening J, Bottelli A, Perin PC, Klein NJ, Peakman M, Camussi G. 2003. Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules. *Journal of Immunology*. 171(1):438-46.

Figure 1. Heterogeneity of Enterovirus infection in non-polarized hCMEC/D3, exploratory analysis. Replication in hCMEC/D3 cells of EV strains selected among species, genotypes, genogroups was examined at 24 h p.i. **(A)** Data are represented as mean of 2 independent assays and given as the number of viral genome copies per cell (x-axis) or of infectious particles per cell. Correlation between the yield of virus genome and yield of infectious virus is indicated. **(B)** Kinetics of replication of virus strains of 4 EV genotypes inoculated to non polarized hCMEC/D3 cells. Data are representative of mean of 3 independent replicates for each virus E30 (●), E6 (▲), E-12 (◆), and EV-71 (×). **(C)** Proportion of infected cells at 6 h p.i for 25 viral strains of different genotypes representing the susceptibility spectrum of the hCMEC/D3 cell line. Green and blue (Hoechst) fluorescence indicate the VP1 protein and the cell nucleus respectively. Scale bar, 100 μm. Data are represented as mean ± SD of 3 experiments. **(D)** Cell mortality in 24 hours after infection with various EV strains (n=15). Data are represented as mean ± SD of 4 independent experiments. Gray, ethidium homodimer III positive cells (cell fragments); red, ethidium homodimer III and FITC-Annexin V positive cells (necrotic population); green, FITC-Annexin V (apoptotic population). The blue line indicates the cell mortality threshold at 10% of mock-infected cells.

Figure 2. Principal Component Analysis of EV infection in non polarized hCMEC/D3 cells. Ordination of the data obtained for 15 EV strains using Principal Component Analysis. The horizontal axis is linked to cell susceptibility and the vertical axis to viral production (see legend to figure 1).

Figure 3. Disruption of a microvascular endothelial barrier after infection by various enteroviruses. Polarized hCMEC/D3 monolayers obtained on transwell membranes were infected for 1h at a MOI of 5 to the following EV strains: E-6/CF2660-01 **(A)**, E-

11/CF228046-07 (**B**), E-12/CF1157-91 (**C**), E-30/CF2575-00 (**D**), EV-71/CF166105-10 (**E**), and EV-71/CF160019-10 (**F**). At the indicated time points, the abluminal medium was collected and paracellular permeability was measured. Data are indicated as mean \pm SD of 3 experiments. The number of EV genome copies and infectious virus particles are indicated with grey and dash grey bars, respectively. Permeability coefficients for mock infected and infected barriers are indicated with green and red lines, respectively. Legend: arrows indicate detection of infectious virus particles below the titration threshold; p-value=.001 (***) ; p-value \leq .01 (**); p-value \leq .05 (*).

Figure 4. Disruptive effects of the EV infection on the hCMEC/D3 barriers. hCMEC/D3 barriers were observed with scanning electron microscopy: mock infected monolayers (**A–C**), and barriers infected with E-6/CF2660-01 (**D–F**), E-12/CF1157-91 (**G–I**), E-30/CF2575-00 (**J–L**), and EV-71/CF166105-10 (**M–O**). Left panels show infected monolayers at 300X magnification (bar, 50 μ m). The middle right panels were obtained at higher magnifications (bar, 10 μ m), 1000X and 2000X respectively. Breaches through the barriers are indicated by white arrow heads, cells with a necrotic or an apoptotic shape are indicated with red and green arrow heads respectively. Round cells with no signs of altered plasma membrane are shown with blue arrow heads.

Figure 5. Ultrastructural features of hCMEC/D3 barriers infected with an E-6 strain. Infected hCMEC/D3 barriers were observed at low magnification with transmission electron microscopy 24 h p.i (**A** and **B**). Virus-induced reorganization of cytoplasmic elements: accumulation of vesicular structures, relocation of mitochondrion network, and components suggestive of autophagic vacuoles (**C**). Features of the vesicular structure: single and double membrane vesicles; positive curvature of tubular structures (**D**). Dense electron punctuation

suggestive of virus aggregates (**E**). Bars, 4 μm (**A** and **B**); 500 nm (**C–E**). Abbreviations: N, nucleus; M, mitochondria; MC, membranous replication complex; A, autolysosome/amphisome; V, virus aggregates.

Figure 6. Ultrastructural features of hCMEC/D3 barriers infected with an EV-71 strain.

Infected hCMEC/D3 barriers were observed at low magnification with transmission electron microscopy 24 h p.i. displayed large areas of unaltered cells (**A** and **B**). Infected cells exhibit clusters of mitochondria and virus-induced vesicular structures (**C** and **D**). The vesicular complex was observed at low magnification to show the density of single membrane and multilamellar vesicles (**E** and **F**) and at higher magnification (**G–I**). Bar, 10 μm (**A–D**); 1 μm (**E** and **F**); 500 nm (**G–I**). N, nucleus; M, mitochondria; MC, membranous replication complex; A, (E, G and H) are high magnification of (C), (F and I) are high magnification of (D).

Figure 7. The actin cytoskeleton network is disrupted in EV-infected hCMEC/D3 cells.

The red fluorescence shows the actin network, the green fluorescence, the viral VP1 protein, and the blue fluorescence indicates the Hoechst-stained nuclei. The hCMEC/D3 cells were infected with virus strains of the following EV genotypes and observations were done at 6 h p.i.: E-12/CF1157-91 (**A–C**), E-6/CF2660-01 (**D–I**), E-30/CF2575-00 (**J–L**), E-11/CF228046-07 (**M–O**), and EV-71/CF166105-10 (**P–R**); mock-infected cells (**S–U**). Bars represent 10 μm .

Figure 8. Perinuclear relocation of active mitochondria in EV-infected hCMEC/D3 cells.

The red fluorescence shows active mitochondria, the green fluorescence, the viral VP1 protein, and the blue fluorescence indicates the Hoechst-stained nuclei. The hCMEC/D3 cells

were infected with virus strains of the following EV genotypes and observations were done at 6 h p.i.: E-12/CF1157-91 (**A–C**), E-6/CF2660-01 (**D–F**), E-30/CF2575-00 (**G–I**), E-11/CF228046-07 (**J–L**), and EV-71/CF166105-10 (**M–O**); mock-infected cells (**S–U**). White arrow heads indicate mitochondria relocated as dense clusters. Cells with intermediate levels in mitochondria clustering are indicated with yellow arrow heads. Bars represent 10 μ m.

FIGURE 1

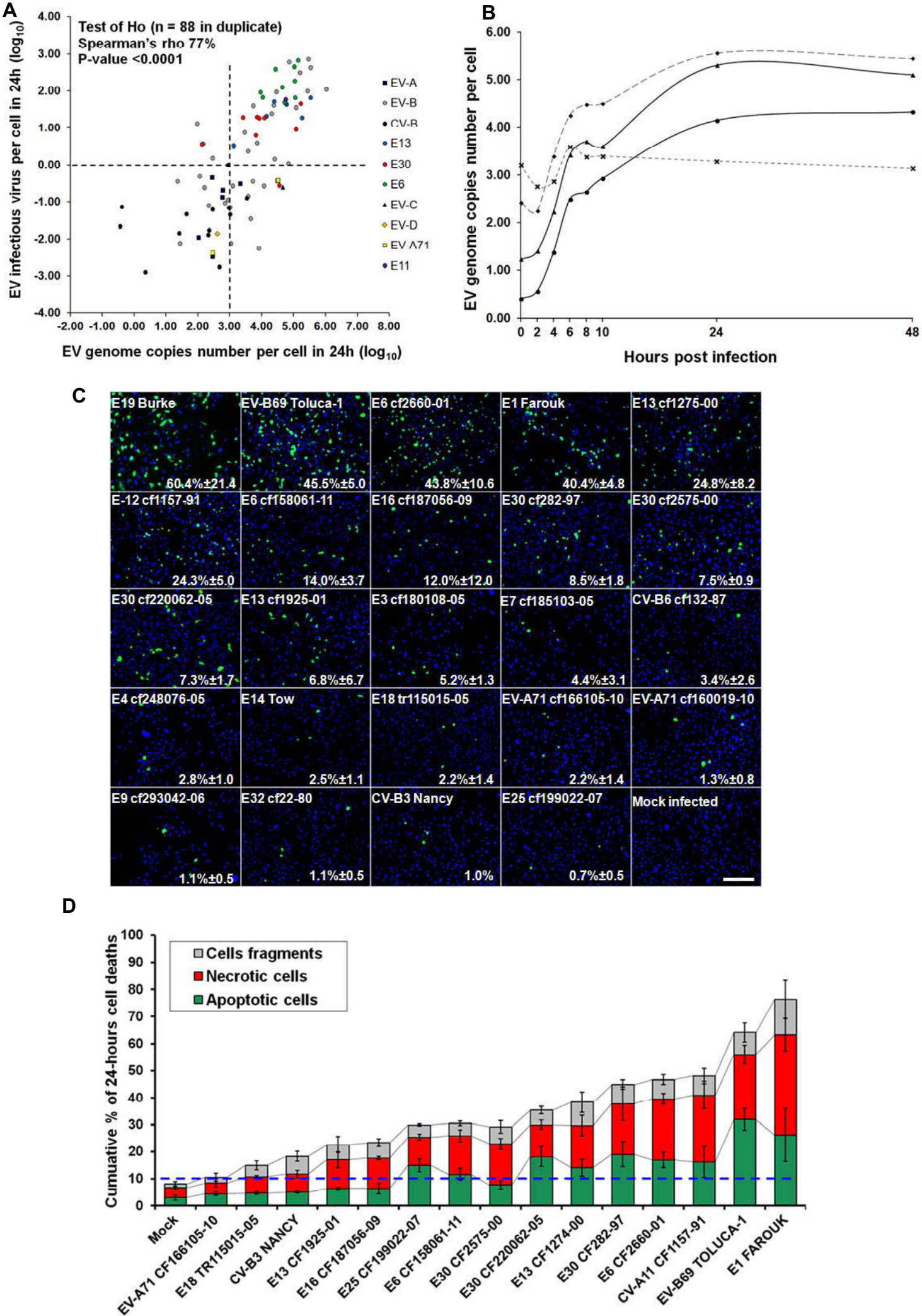


FIGURE 2

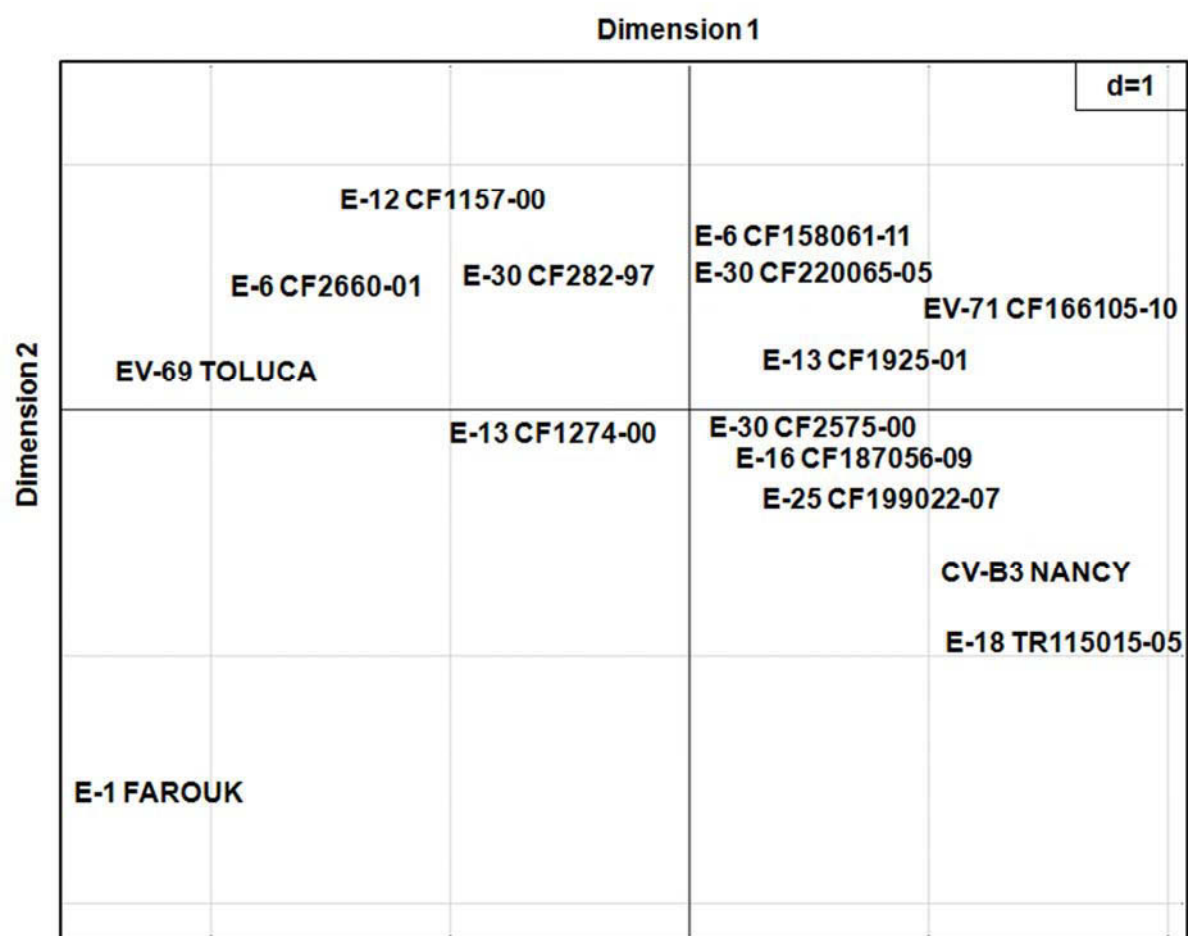
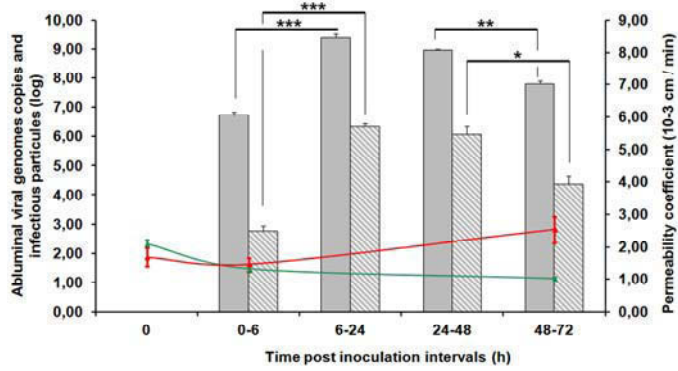
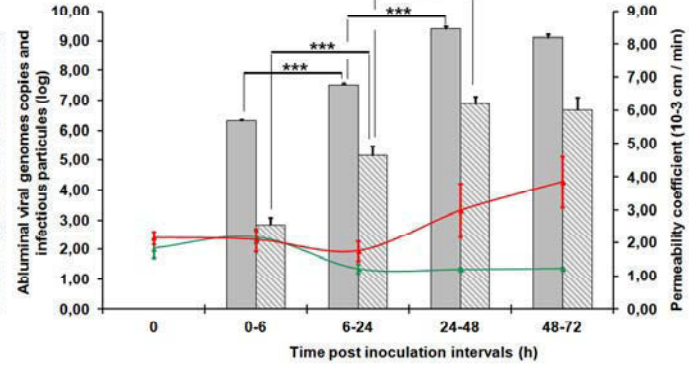


FIGURE 3

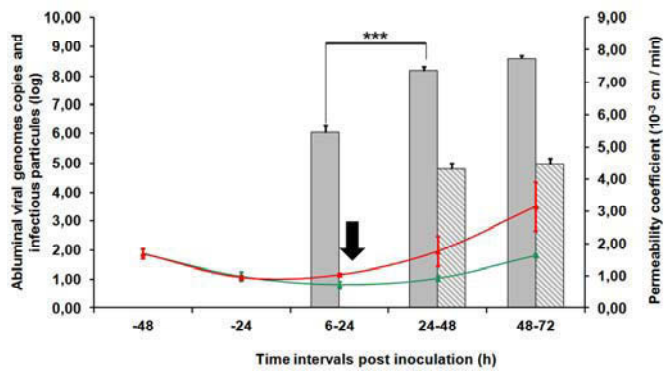
A



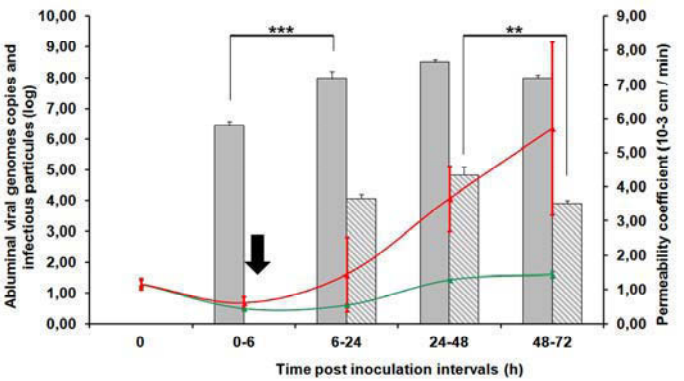
B



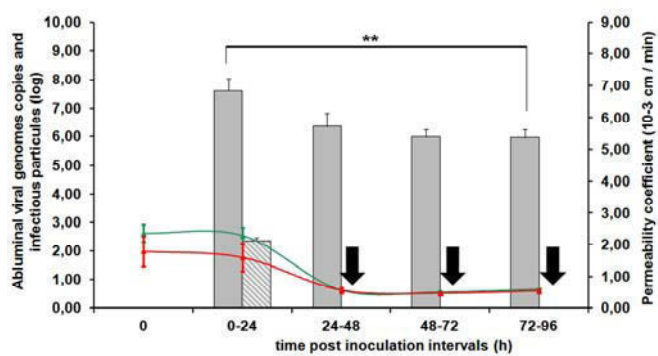
C



D



E



F

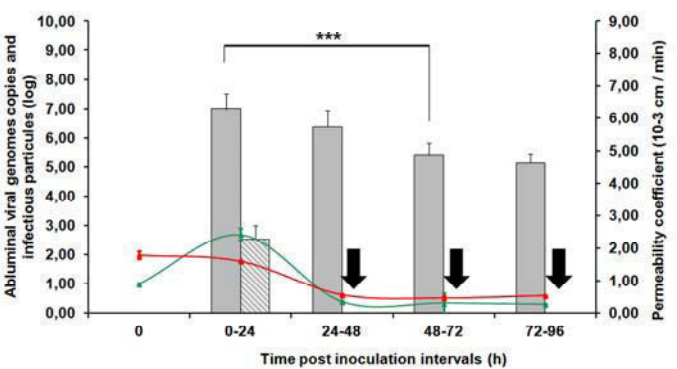


FIGURE 4

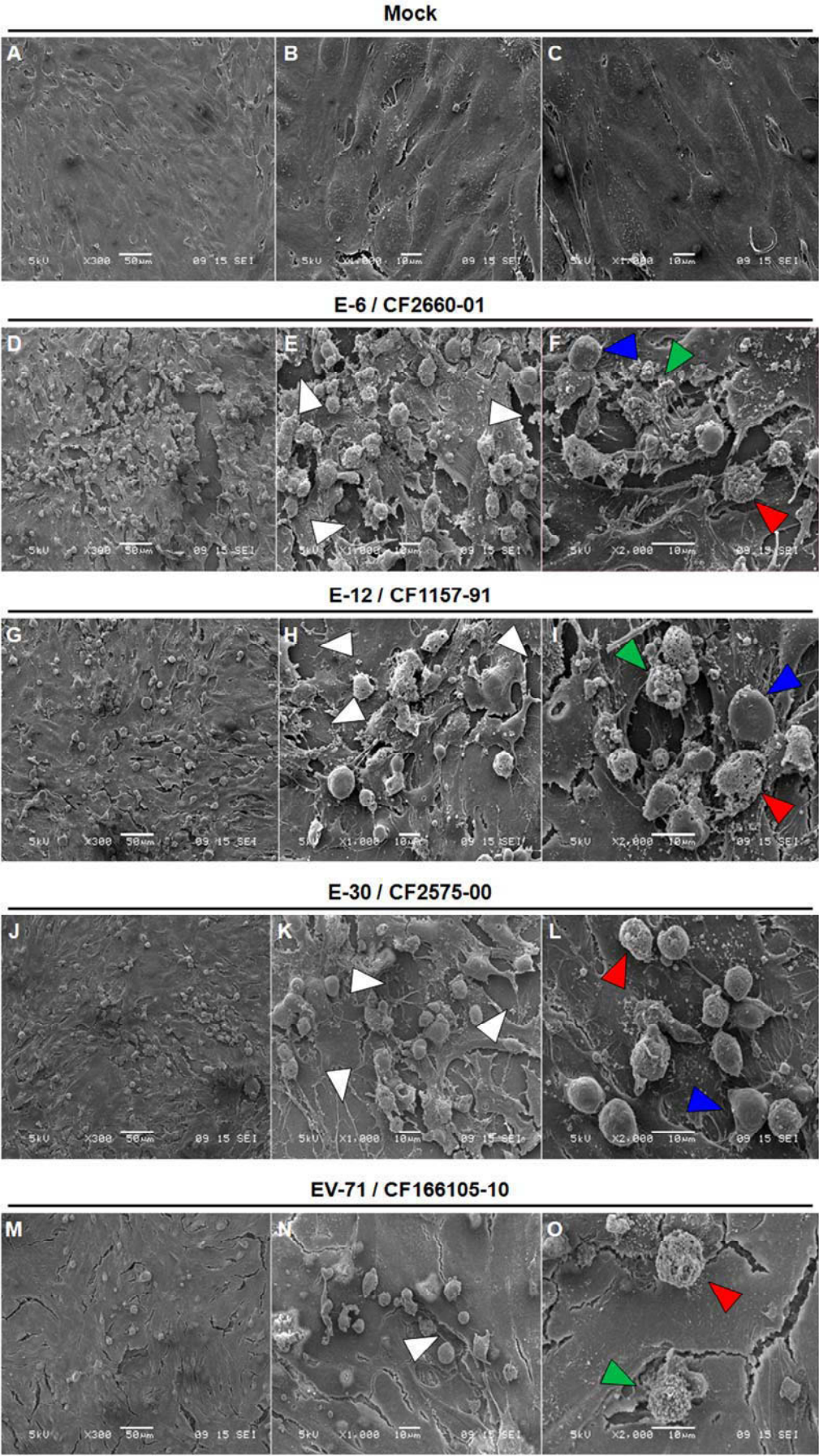


FIGURE 5

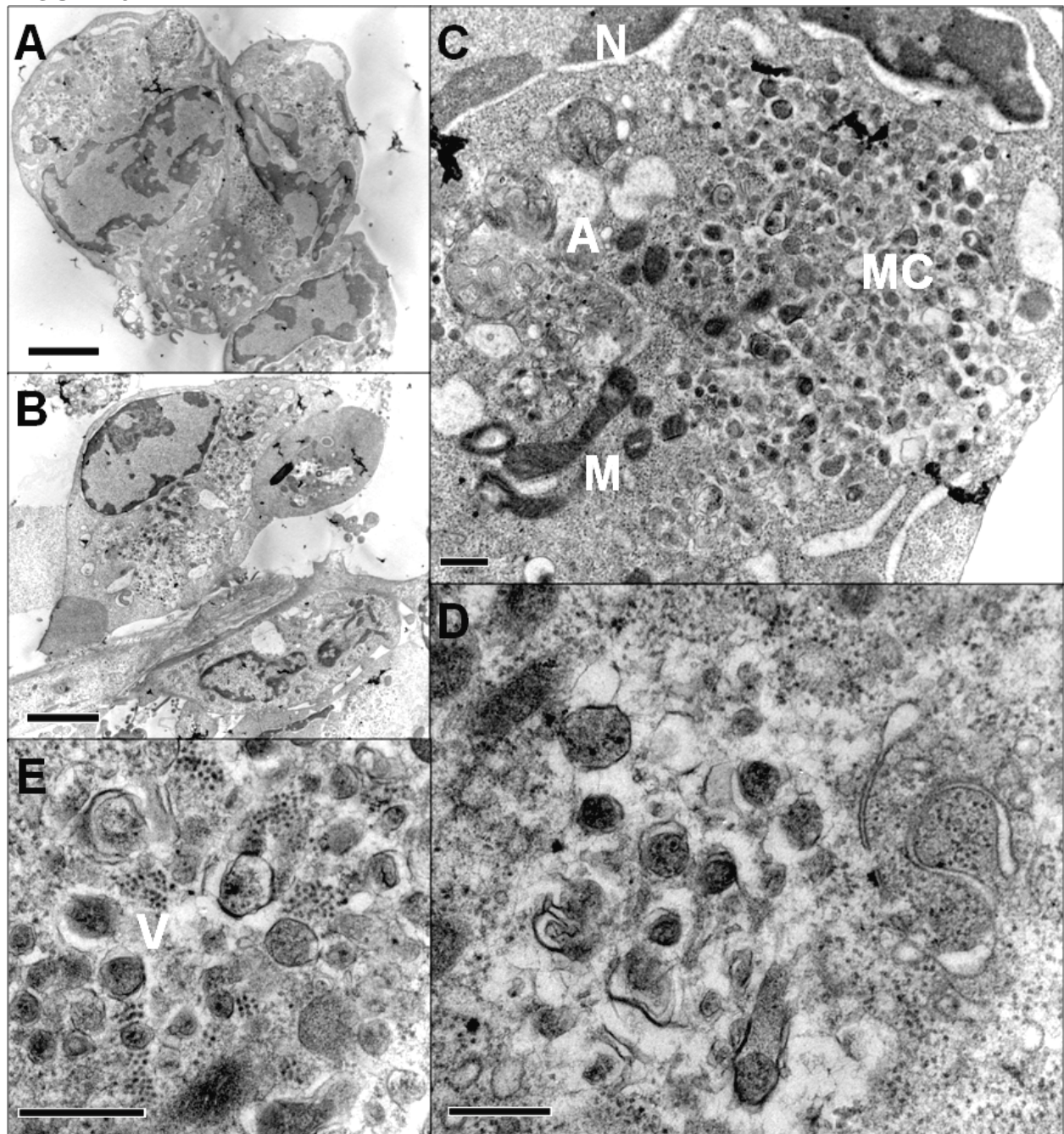


FIGURE 6

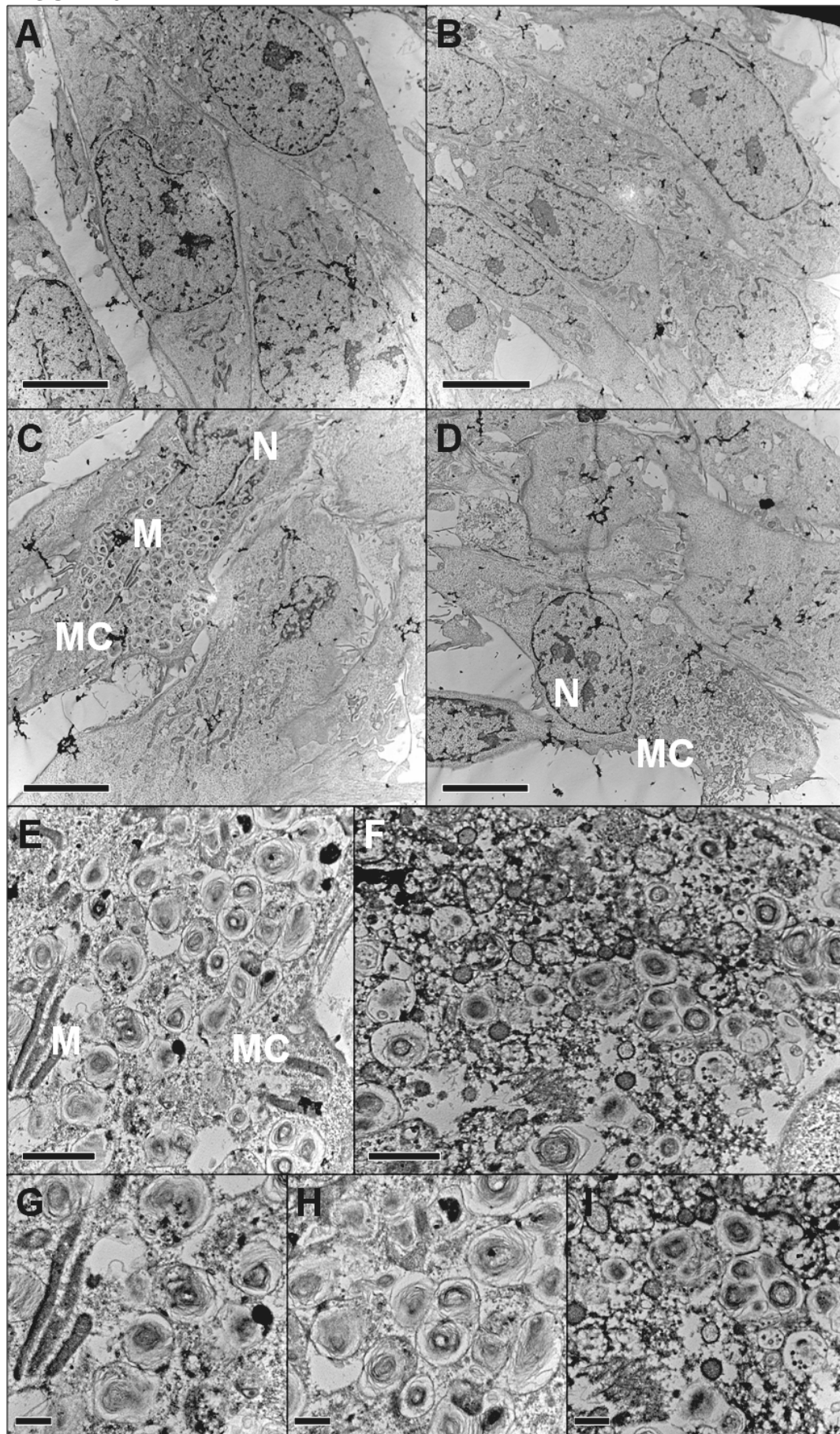


FIGURE 7

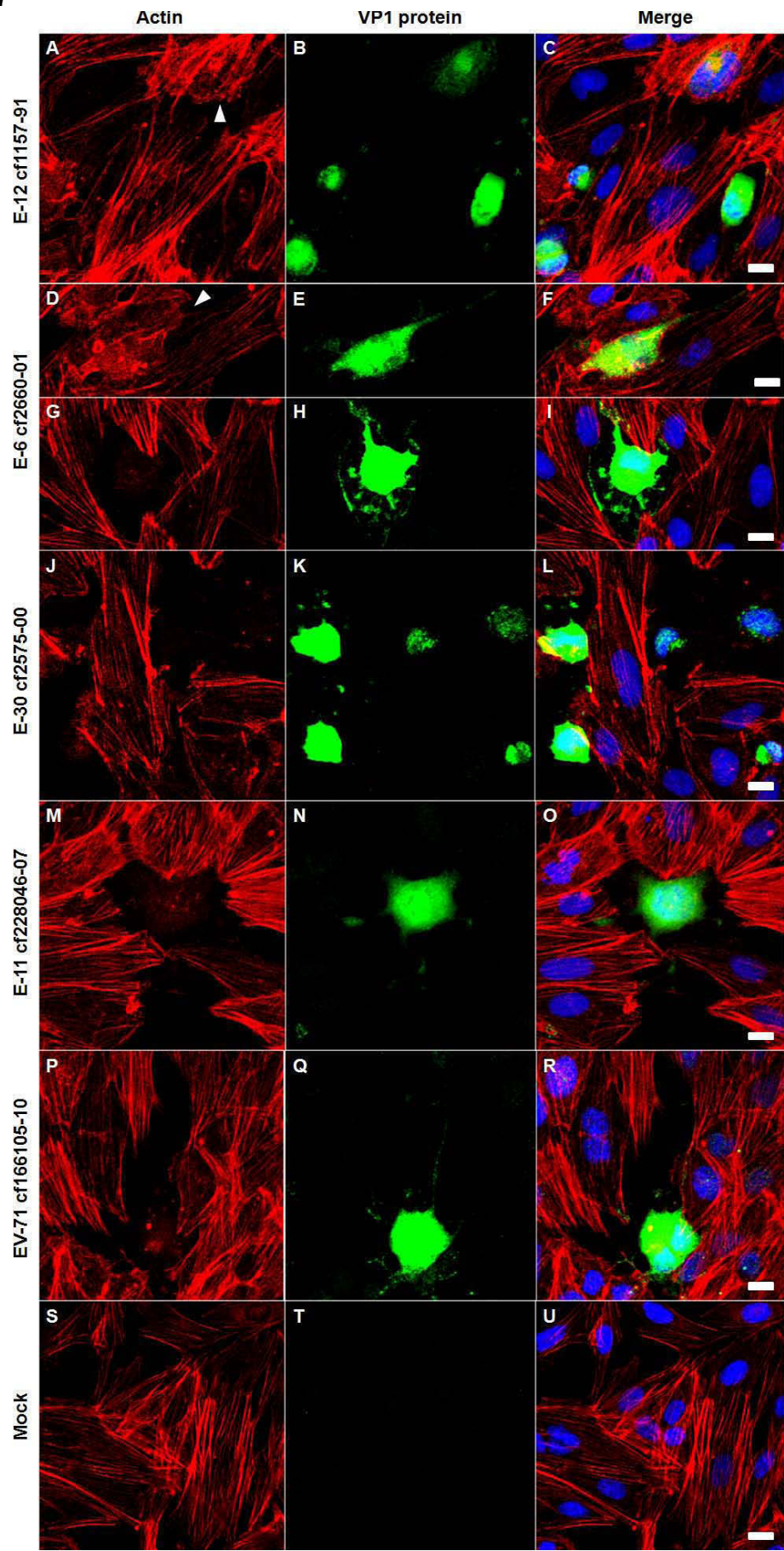


FIGURE 8

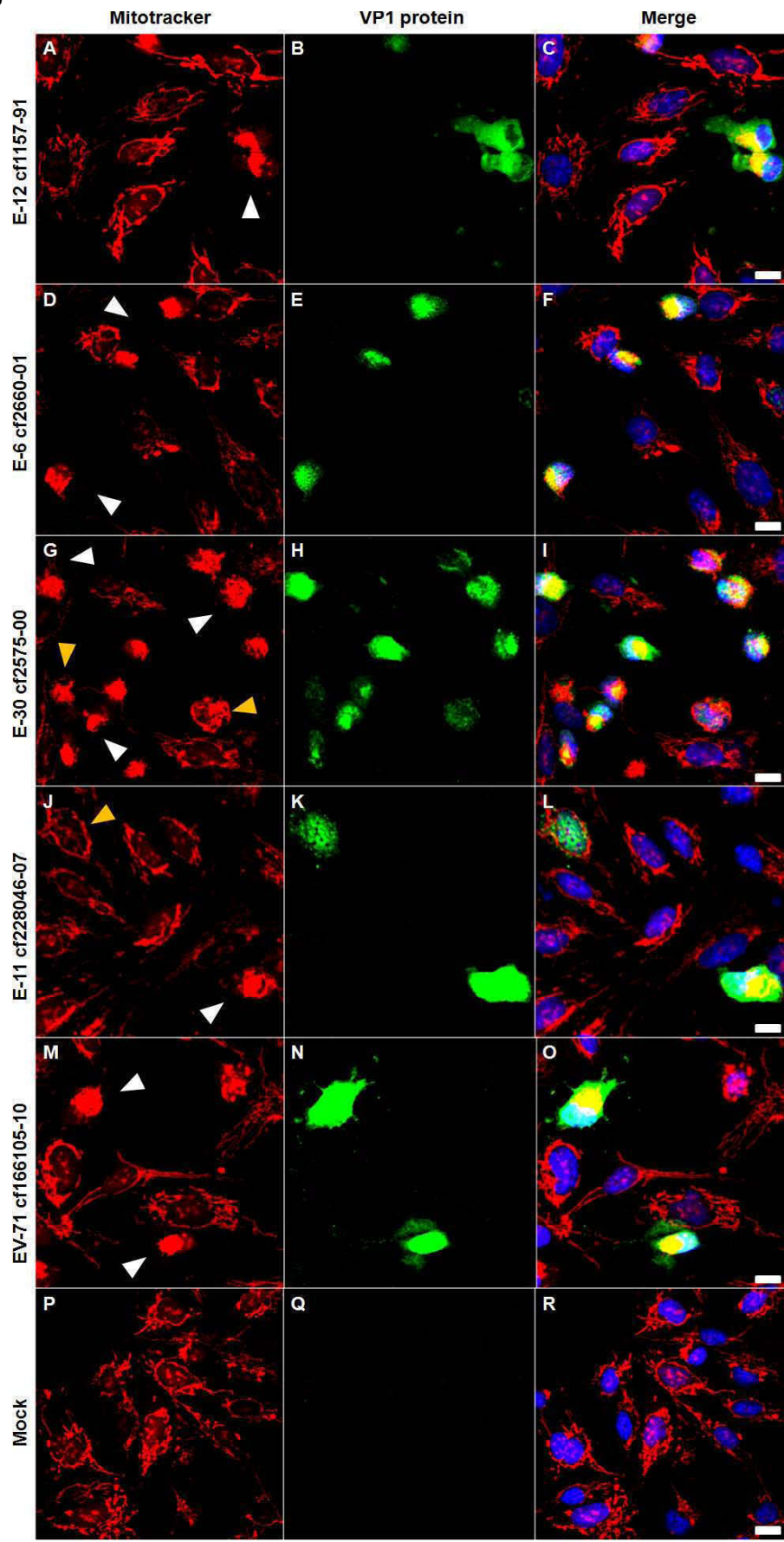


TABLE I

General features of Enterovirus strains			Clinical features	
Species	Serotypes	Strains	Isolation source	Clinical manifestations
A	CV-A2	CF192073-11	Throat	Encephalitis
		CF197013-11	Feces	Guillain Barre
	CV-A4	CF308011-10	Throat	Hand-Foot and Mouth disease
		CF063006-11	Feces	Fever
	CV-A5	CF193056-11	Feces	Acute meningitis
	CV-A6	CF218013-10	Throat	Hand-Foot and Mouth disease
		CF605-00	Feces	Septic shock
	EV-A71	CF166105-10	Throat	Hand-Foot and Mouth disease
		CF160019-10	Throat	Hand-Foot and Mouth disease
	CV-A9	CF027040-07	Throat	Acute meningitis
B	CV-B1	CF741-93	Feces	
		CF217010-08	Feces	
	CV-B2	CF314051-04	Throat	
		CF186019-07	Throat	Acute meningitis
	CV-B3	NANCY	Stools	Minor febril illness
		CF183076-08	Throat	Acute meningitis
	CV-B4	CF193061-05	Throat	Acute meningitis
		CF169091-07	Throat	Acute meningitis
	CV-B5	CF516-00	CSF	Headache; Fever; Vomiting
		CF186106-05	Throat	Acute meningitis
	CV-B6	CF202076-06	Throat	Acute meningitis
		SCHMITT	Stools	None
	E1	CF132-87		
	E2	FAROUK	Stools	None
		CORNELIS	Stools	Acute meningitis
	E3	CF307001-05	Feces	Acute meningitis suspected
		MORRISSEY	Stools	Acute meningitis
	E4	CF180108-05	Throat	
		DUTOIT		
	E5	CF248076-05	Feces	
		CF101013-08	Feces	Acute meningitis
	E6	NOYCE	Stools	Acute meningitis
		CF990-00	CSF	Acute meningitis
	E7	CF2660-01	CSF	Acute meningitis
		CF1057-00	CSF	Acute meningitis
	E8	CF328087-03	Throat	Acute meningitis
		CF671-00	CSF	Acute meningitis
	E9	CF1634-01	CSF	Acute meningitis
		CF1679-02	CSF	Acute meningitis
	E10	CF158061-11	Throat	
CF185010-11		Throat	Acute meningitis	
E11	WALLACE	Stools	None	
	CF185103-05	Throat	Acute meningitis	
E12	CF293042-06	Throat	Acute meningitis	
	CF22-80			
E13	CF1462-00	CSF	Acute meningitis	
	CF228046-07	Throat	Acute meningitis suspected	
E14	CF1157-91			
	DELCARMEN	Stools	None	
E15	CF1083-91			
	CF1274-00	CSF	Acute meningitis	
E16	CF1925-01	CSF	Acute meningitis	
	CF1393-00	CSF	Acute meningitis	
E17	CF1901-00	Throat	Acute meningitis	
	CF282003-06	Throat	Acute meningitis	
E18	TOW	Stools	Acute meningitis	
	CF225059-08	Feces		
E19	CHARLESTON	Stools	None	
	CF187056-09	Feces	Acute meningitis	
E20	CF596-78			
	METCALF	Stools	Diarrhea	
E21	CF279084-05	Throat	Acute meningitis	
	TR115015-05			
E22	BURKE	Stools	Diarrhea	
	JV1	Stools	Fever	
E23	FARINA	Stools	Acute meningitis	
	DECAMP	Stools	Diarrhea	
E24	JV4	Stools	Diarrhea	
	CF205083-06	Throat	Acute meningitis	
E25	CF199022-07	Feces	Acute meningitis	
	CORONEL	Stools	None	
E26	BACON	Stools	None	
	JV10	Stools	None	
E27	BASTIANNI	CSF	Acute meningitis	
	CF1260-78			
E28	CF1074-78			
	CF282-97	Feces	Acute meningitis	
E29	CF552-00	Feces	Acute meningitis	
	CF2575-00	CSF	Acute meningitis	
E30	CF220062-05	Throat	Acute meningitis	
	CF307026-07	Throat	Acute meningitis	
E31	CF284052-07	Throat	Acute meningitis	
	CALDWELL	Stools	Acute meningitis	
E32	CF235069-05	Throat	Acute meningitis	
	TOLUCA1	Rectal swab	None	
EV-B69	CF496-99	Feces		
EV-B77				
C	CV-A21	CF1069-91		
D	EV-D70	CF670-71		

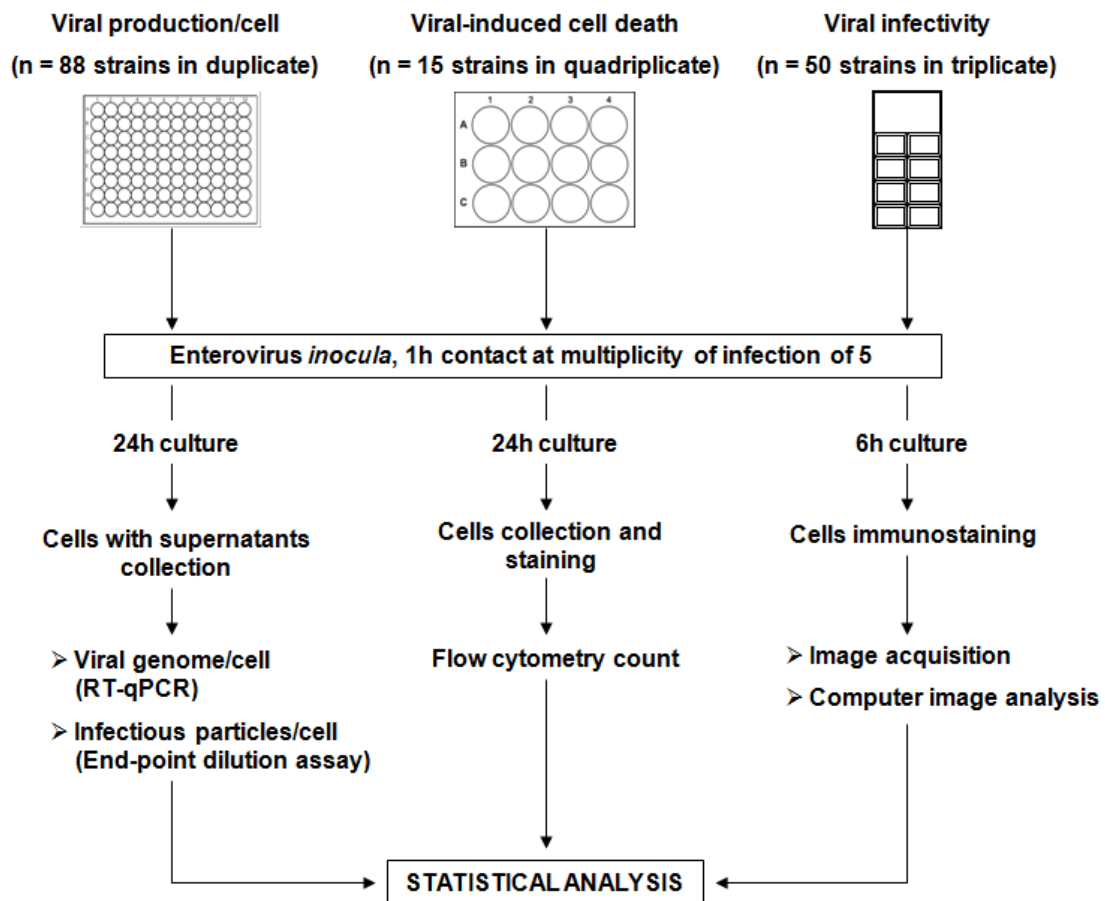


FIGURE S1 Schematic of screening strategy.

Viral production per cell was assessed on 96-wells plates inoculated in two independent replicates by 88 different EV strains. At 24 h p.i, the whole cells and supernatant were harvested. Virus genomes and infectious particles amounts were respectively quantified by RT-qPCR and viral titration. Cell mortality of infected cells was estimated on 12-wells plates inoculated in 4 independent replicates by 15 different EV strains. At 24 h p.i, cells were collected, stained for apoptosis and necrosis, and counted by flow cytometry. Viral infectivity was assessed on 8-wells labtek® culture slides inoculated by 50 different EV strains. At 6 h p.i, before massive release of progeny viruses, cells were fixed, immunostained for viral protein VP1 and nuclear DNA, and observed at low magnification (10X) with epifluorescence microscopes. Fluorescent images acquired were then analyzed by computer to determine the total number of cell and the number of infected cell.

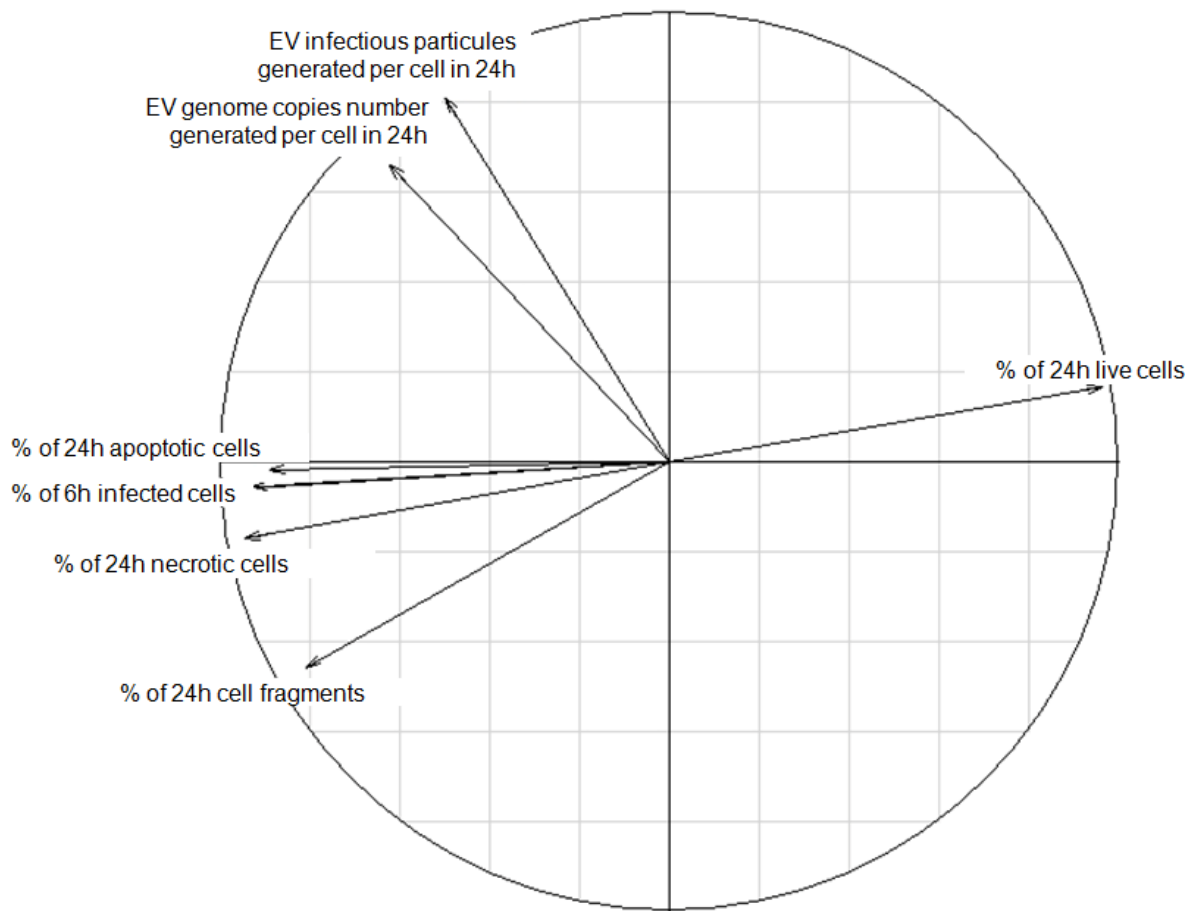
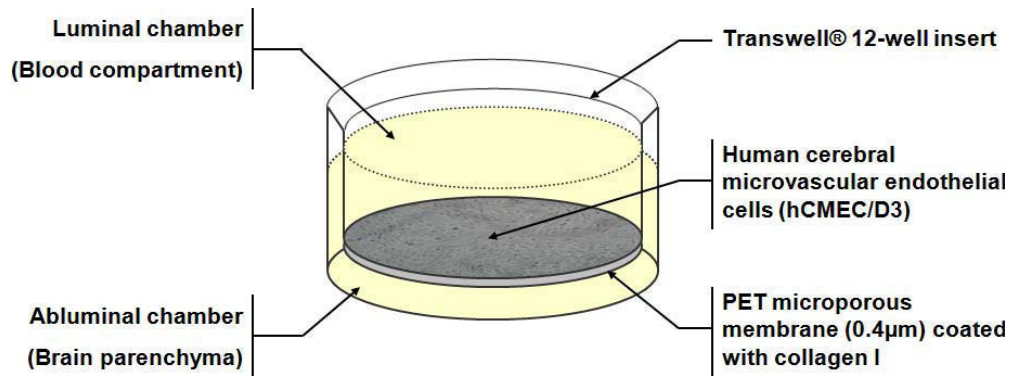


FIGURE S2 Principal Component Analysis correlation circle

Variables linked with horizontal and vertical axis.

FIGURE S3

A



B

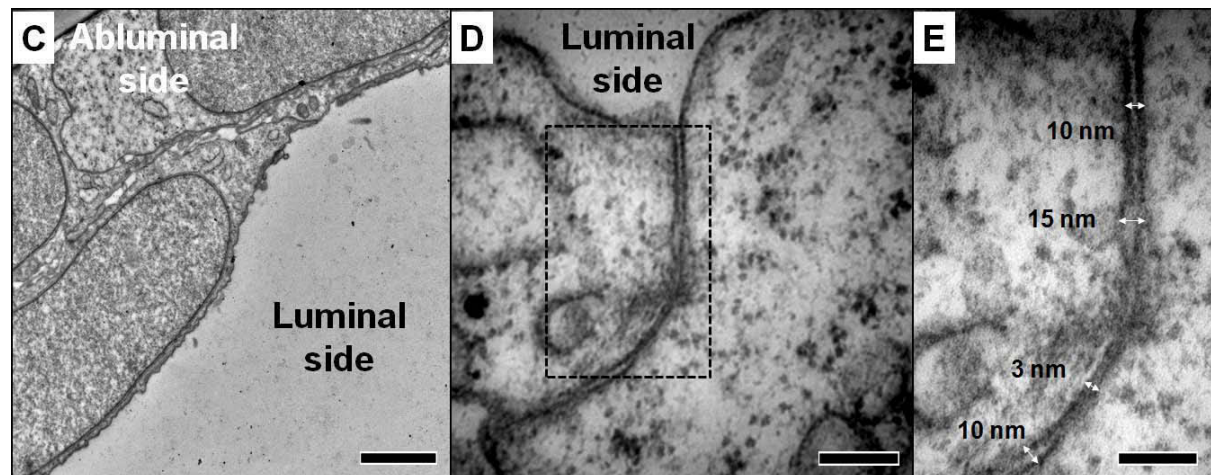
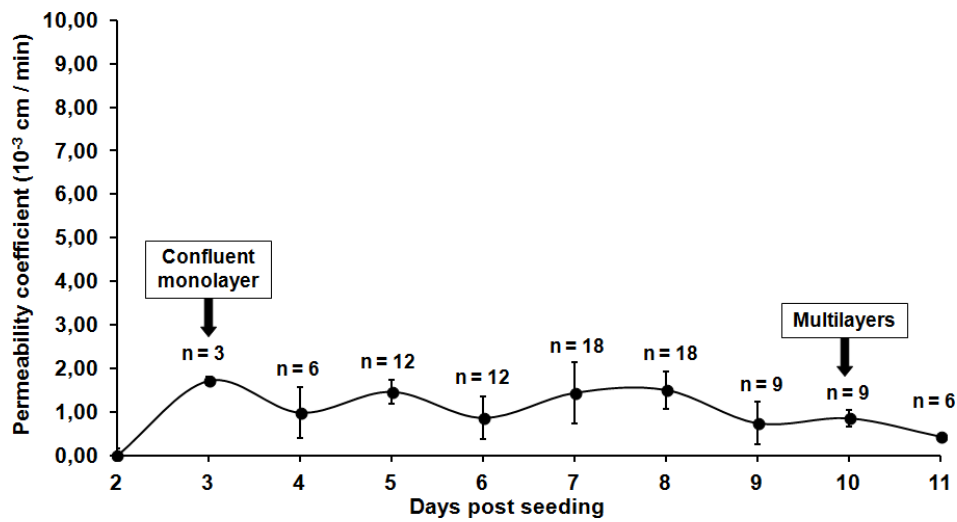


FIGURE S3 In vitro model of brain endothelial barrier of polarized hCMEC/D3

Schematic of the In vitro model of brain endothelial barrier by culture of hCMEC/D3 cells at the surface of a membrane (0.4 μm pore) coated with rat collagen-I included within the upper chamber of a Transwell® device (**A**). Lucifer yellow paracellular permeability was measured for 11 days after seeding cells in different independent experiments representative of triplicate cultures (**B**). Transverse observations by transmission electron microscopy of a polarized hCMEC/D3 cell monolayer (7 days culture), scale bar 2 μm (**C**). Intercellular junction, scale bar 200nm (**D**), with a high magnification showing an electron-dense tight junction, with the measurements of Intercellular spaces, scale bar 100nm (**E**).

FIGURE S4

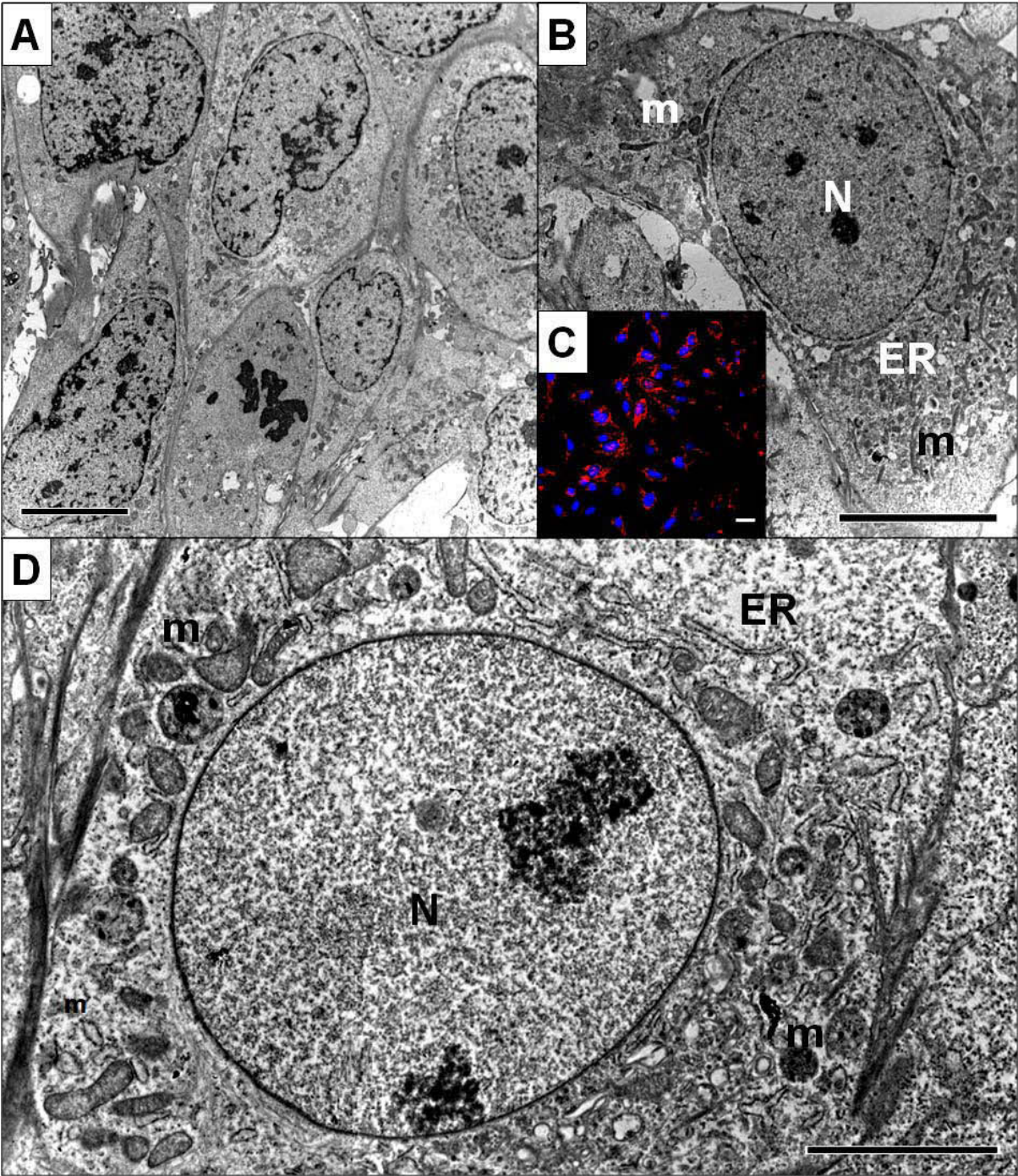
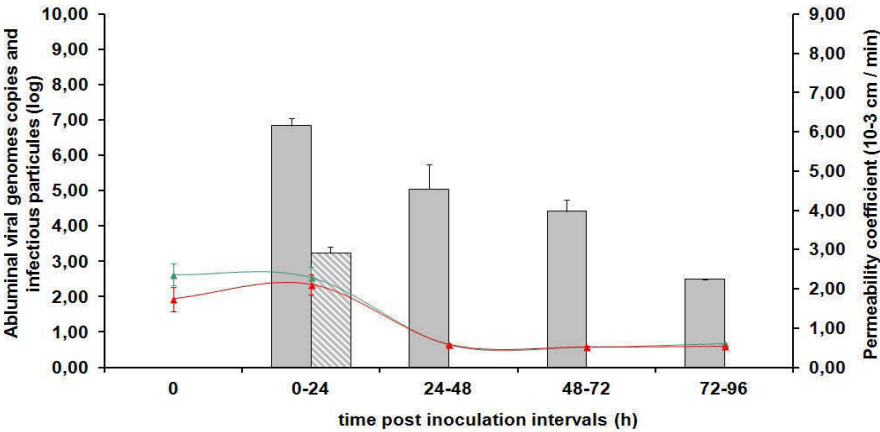


FIGURE S4 Ultrastructural features of mock infected- *in vitro* brain endothelium model.

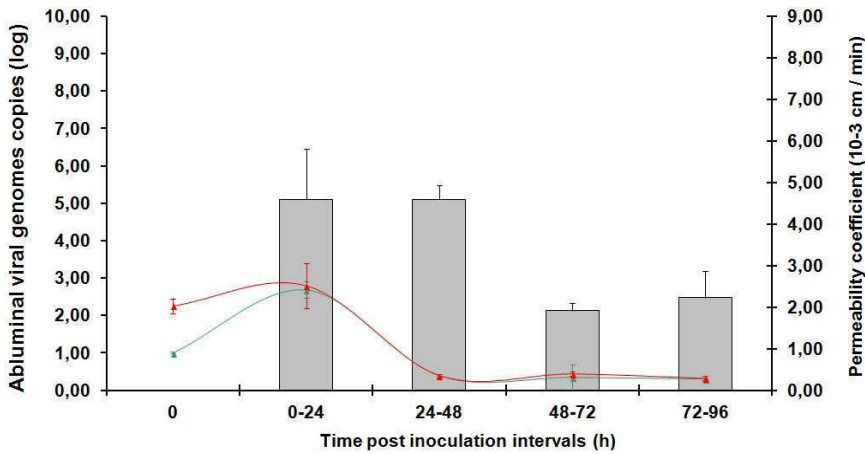
Low-magnification transmission electron micrograph of 7-days cultures hCMEC/D3 monolayers (**A** and **B**). Confocal observation of mitochondria network (red) in hCMEC/D3 cells (**C**), High magnification transmission electron micrograph of 7-days cultures hCMEC/D3 monolayer. A central nucleus is surrounded by plenty of mitochondria near the rough endoplasmic reticulum (**D**). Bars represent, 10 μ m (A – C); 5 μ m (D). N, nucleus; M, mitochondria; ER, endoplasmic reticulum.

FIGURE S5

A



B



C

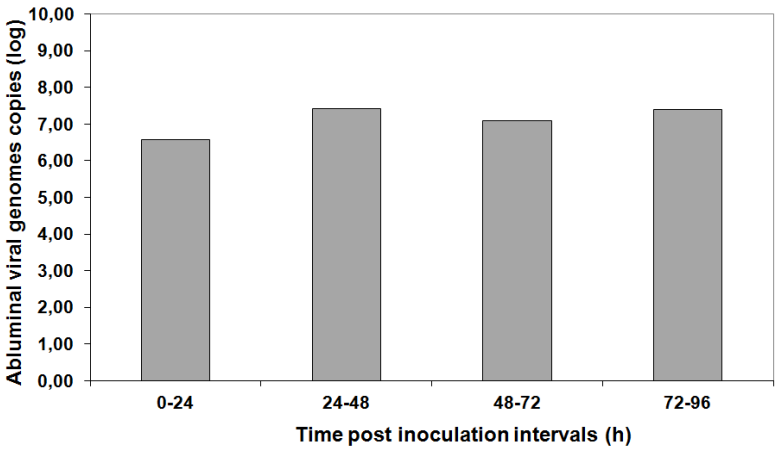


Figure S5. Translocation of a microvascular endothelial barrier after infection by various enteroviruses. Polarized hCMEC/D3 monolayers obtained on transwell membranes were infected for 1h at a MOI of 5 to the following EV strains: CV-A5/CF193056-11 (**A**), CV-B5/CF202076-06 (**B**), and CV-B3/CF192061-05 (**C**). At the indicated time points, the abluminal medium was collected and paracellular permeability was measured. Excepted for CV-B3, data are indicated as mean \pm SD of 3 experiments. The number of EV genome copies and infectious virus particles are indicated with grey and dash grey bars, respectively for CV-A5. The number of EV genome copies was only determined for CV-B5 and B3. Excepted for CV-B3, permeability coefficients for mock infected and infected barrier are indicated with green and red lines, respectively.